

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias
División de Estudios de Posgrado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AMPLIFICACION Y DELECIÓN POR RECOMBINACION
ENTRE nifH DE Rhizobium phaseoli
¿UN FENOMENO GENERAL ENTRE CEPAS?

T E S I S
Que para obtener el Grado Académico de
MAESTRO EN CIENCIAS
p r e s e n t a
CESAR RODRIGUEZ SANCHEZ

Director de Tesis:
DR. DAVID RENE ROMERO CAMARENA



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 está 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.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
La Fijación Biológica del Nitrógeno.	2
Interacción <u>Rhizobium</u> -leguminosas.	4
Taxonomía de <u>Rhizobium</u> .	6
El Genoma de <u>Rhizobium</u> .	9
Planteamiento y objetivo del trabajo.	13
Estrategia experimental.	17
MATERIALES Y METODOS	
Cepas	19
Medios y Condiciones de cultivo.	20
Conjugación.	21
Detección de plásmidos.	22
Aislamiento de DNA total.	23
Condiciones de digestión con endonucleasas de restricción.	24
Electroforesis de DNA total.	25
Transferencia del DNA de un gel a membranas de nitrocelulosa.	25
Hibridización.	
a) Detectores.	26
b) Marcaje Radiactivo.	27
c) Hibridización.	27
d) Autorradiografía.	28
Análisis de perfiles de hibridización por densitómetro.	29
Mapeo de las deleciones.	29
RESULTADOS	
Ocurren los rearrreglos más frecuentes del pSim de <u>R.1.</u> bv. phaseoli entre las reiteraciones <u>nifH</u> .	32
Construcción de las cepas de <u>R.1.</u> bv. phaseoli con el cassette CDYN1 en los genes <u>nifH</u> .	33
Cepas del Tipo I: TAL-182 y NITRAGIN-8251.	
Amplificaciones.	34
Deleciones.	39
Cepa del Tipo II: CIAT-894.	
Amplificaciones.	42
Deleciones.	43
Cepa del Tipo III: BRASIL-5.	
Deleciones.	45
Cepa del Tipo IV. F-14.	
Deleciones.	47
DISCUSION	
a) Plasticidad del Genoma de <u>R.1.</u> bv. phaseoli.	49
b) Consecuencias fenotípicas de los rearrreglos.	54
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFIA	63
- Tablas I, II y III	74 - 76
- Figuras 1 a 25	77 - 102
- Mapas I a V	103 - 107

RESUMEN

Amplificación y delección por recombinación entre *nifH* de *Rhizobium phaseoli* ¿Un fenómeno general entre cepas?

Recientemente, han detectado la ocurrencia de eventos frecuentes de amplificación y delección en el plásmido simbiótico de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* CFN-42. Estos eventos afectan la región nod-nif de este plásmido, y estas son comúnmente generadas por recombinación entre los operones reiterados nifHDK (1). Concebiblemente, estos rearrreglos podrían ocurrir en los plásmidos simbióticos de otras cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Sin embargo, este biovar presenta un alto grado de diversidad genética. Un estudio previo de genética de poblaciones, enfocado en mayor medida a los caracteres cromosomales, indica la existencia de seis linajes separados en este biovar, con distancias genéticas más alejadas entre ellas que las reportadas para cualquier otra especie de bacterias (2). Estos datos elevan la pregunta de que tan comunes son los rearrreglos en el plásmido simbiótico en diferentes miembros de este biovar. Para analizar esta pregunta, se estableció una colección de cinco cepas (TAL-182, NITRAGIN-8251, CIAT-894, BRASIL-5 y F-14) las cuales representan algunos de los linajes descritos para este biovar. El plásmido simbiótico de cada cepa fue marcado por la introducción del cassette GDYNI (1), este provee un sistema de selección positiva para diferentes tipos de rearrreglos genómicos. Después de la selección, las cepas que tenían rearrreglos fueron caracterizadas por hibridización contra un juego ordenado de clones de los cósmidos del plásmido simbiótico de la cepa CFN-42 (3). Los datos obtenidos indican que: (a) los eventos de amplificación y delección ocurren a alta frecuencia en los plásmidos simbióticos de las distintas cepas de este biovar; (b) frecuentemente, estos rearrreglos fueron generados por recombinación entre los operones reiterados nifHDK. Sin embargo, algunas cepas presentan tipos nuevos de rearrreglos y (c) a pesar de la presencia de numerosos RFLP's, la organización global de la región nod-nif parece ser similar entre las cepas pertenecientes a los distintos linajes cromosomales.

- (1) Romero, D. et al., J. Bacteriol. 173:2435-2441 (1991).
 (2) Piñero, D. et al., Appl. Environ. Microbiol. 54:2825-2832 (1988).
 (3) Girard, M.L. et al., J. Bacteriol. 173:2411-2419 (1991).

INTRODUCCION

LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO

En la naturaleza, los organismos han desarrollado distintas estrategias para satisfacer sus necesidades, siendo una de las más relevantes la de asimilación de compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados para a su crecimiento y desarrollo. De los elementos presentes en la biósfera, el nitrógeno y los compuestos nitrogenados son requeridos para sintetizar sus componentes esenciales. Así, aunque el N_2 representa el 78% de los gases atmosféricos, solamente algunos organismos procariotes son capaces de captarlo y reducirlo a amonio; los demás organismos sólo lo asimilan en sus formas combinadas como nitrito, nitrato, amonio o compuestos orgánicos.

Newton (1987) señala que el nitrógeno atmosférico puede ser fijado a través de varios procesos; a) los no biológico naturales que contribuyen en un 15%, b) la producción industrial de amonio para fertilizante aporta el 25% y c) la fijación biológica que representa el 60%. Al respecto Kuhlbusch, et al (1991) mencionan que una proporción considerable (del 5 al 50%) del nitrógeno fijado biológicamente es reincorporado en la atmósfera como nitrógeno molecular por la denitrificación durante la oxidación de la biomasa.

Aunque la fijación biológica del nitrógeno esta limitada a los procariotes, no es una característica exclusiva de un sólo grupo; ésta actividad está presente en familias no relacionadas

de organismos, entre estos encontramos; los gram-positivos, gram-negativos, fotosintéticos, heterotróficos, anaerobios obligados, facultativos y bacterias aeróbicas. Independientemente del tipo de organismo, el origen común de esta función es evidente dada la similitud de las características físicas y propiedades químicas del complejo enzimático y la conservación de las secuencias génicas de las nitrogenasas presente en los procariotes fijadores de nitrógeno.

El complejo enzimático de la nitrogenasa consta de dos componentes proteícos. Una es la proteína Mo-Fe, llamada dinitrogenasa, y la otra una proteína que contiene -Fe, la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa es un tetrámero de 245KDa compuesto de dos pares de diferentes subunidades (2 2); que contiene cuatro núcleos (4Fe-4S) y dos moléculas del cofactor Mo-Fe, que es un componente esencial, constituido por ocho átomos de fierro y seis de azufre por átomo de molibdeno, formando el núcleo 4Fe-4S. La dinitrogenasa reductasa es un dímero de 64KDa compuesto de dos subunidades idénticas con un núcleo simple (4Fe-4S) (Burris, 1991). La descripción más completa del mecanismo para la reducción del N_2 por la nitrogenasa es la propuesta por Lowe-Thorneley, en donde se señala que la disociación del complejo constituido por la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa después de la transferencia de un electrón con la concomitante hidrólisis de MgATP, es el paso limitante para toda la reacción de nitrogenasa (Smith, 1990).

Otra característica común de las nitrogenasas es su sensibilidad al oxígeno, ya que éste la inactiva.

irreversiblemente y reprime la síntesis de sus componentes proteicos. Así los organismos fijadores de nitrógeno tienen distintos mecanismos de protección al oxígeno como: la difusión controlada, protección respiratoria, actividad de hidrogenasa, producción de enzimas antioxidantes y cambios conformacionales.

En particular las bacterias de los géneros Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium y Sinorhizobium establecen relaciones mutualistas con las raíces de algunas leguminosas, en estructuras altamente diferenciadas denominadas "nódulos", donde se efectúa la fijación del nitrógeno atmosférico. Es notable que sólo un 1% de todas las especies de angiospermas desarrollaran este tipo de simbiosis.

INTERACCION Rhizobium - LEGUMINOSAS

Para establecer esta relación simbiótica, se requieren de varios mecanismos tanto de la bacteria como de la planta que permite la interacción entre estos organismos, los cuales se describen brevemente a continuación.

Esta interacción se inicia debido al reconocimiento específico que realiza la bacteria por los exudados de raíz de la planta, adhiriéndose a los pelos radiculares y colonizando la superficie de la raíz. Posteriormente ocurre la deformación de los pelos radiculares con la subsecuente invasión bacteriana. Las bacterias crecen y penetran las distintas capas celulares de la raíz, a través de un hilo de infección originado a partir de los

tejidos vegetales. Cuando el hilo de infección alcanza la corteza externa, se induce una actividad meristemática a distancia sobre las células de la corteza interna, generándose un meristemo que forma un nódulo primario. En el momento en que las bacterias alcanzan a éstas células, el hilo de infección se ha ramificado y finalmente se abre llenando a las células vegetales de bacterias diferenciadas y rodeadas por una membrana peribacteroidal. En el estado de bacteroide Rhizobium lleva a cabo la fijación de nitrógeno. El nitrógeno reducido en el nódulo es asimilado por las células vegetales, ya que las enzimas necesarias para la asimilación de amonio están reprimidas en el bacteroide. A su vez, los bacteroides reciben de la planta los metabolitos empleados en la reducción de nitrógeno atmosférico (Long, 1989a).

Debido al gran avance logrado en los últimos años sobre el estudio del proceso la fijación de nitrógeno, hay una vasta información en lo referente a los aspectos más importantes de esta relación en cuanto a: la ecología de las cepas (Bottomley, 1992), la ecología global del ciclo del nitrógeno (Sprent, 1987), la competencia entre cepas (Dowling y Broughton, 1986; Triplett, 1990), el intercambio de señales (Halverson y Stacey, 1986; Dixon y Lamb, 1990; Peters y Verma, 1990), en la diferenciación celular (Rolfe y Gresshoff, 1988), los cambios metabólicos asociados (Dilworth y Glenn, 1984; Layzell, et al., 1990; Appleby, 1984; Evans, et al., 1987) y en los aspectos biotecnológicos (Phillips y Teuber, 1985; Paau, 1989; Ronson, et al., 1990; Bryant, 1991).

TAXONOMIA DE Rhizobium

Woese (1987) incluye en la división alfa de las bacterias púrpuras a la familia Rhizobiaceae y dentro de esta familia Jordan (1984) las agrupa en cinco géneros que se caracterizan por la capacidad de interactuar con plantas superiores. Agrobacterium forma hipertrofias de raíz o tumores, Phyllobacterium produce hipertrofias de hoja, Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium establecen simbiosis con las raíces de las leguminosas. Sin embargo, recientemente Young (1991) al estudiar las filogenias de las secuencias del gen rRNA 16S ha puesto en duda la organización actual de la familia Rhizobiaceae al demostrar que estos genes son muy diferentes entre sí, agrupando a las cepas de Rhizobium, Agrobacterium, Rhocalimaea y Brucella (estas dos últimas son patógenas de animales) y en otro grupo se incluyeron cepas de Bradyrhizobium, Azorhizobium y Rhodopseudomonas.

La división en especies ha sido establecida en base a sus características fenotípicas y principalmente dependiendo del hospedero de cada bacteria, donde la mayoría de los genes que controlan esta respuesta están localizados en plásmidos simbióticos (pSim) de alto peso molecular. Al respecto Broughton, et al (1987) señalan que la transferencia de éstos plásmidos por conjugación parece ser un fenómeno común en Rhizobium, confirmando la capacidad de establecer una simbiosis efectiva, aunque la frecuencia parece ser más alta en laboratorio que en el suelo. El evento natural ha sido apoyado por las inconsistencias

en el agrupamiento de cepas al comparar genotipos plasmídicos o cromosomales (Kaijalainen, 1989).

Considerando lo anterior, está el caso de la soya que puede establecer simbiosis con dos especies diferentes; R. fredii y R. xingiangensis, las cuales posiblemente hayan intercambiado sus plásmidos simbióticos o parte de ello, de manera que pueden nodular al mismo hospedero. En contraste con los otros hospederos de Rhizobium la relación ha sido específica; Eardly, et al (1990) reportan que las variedades de alfalfa perene y cultivada son reconocidas distintivamente por R. meliloti pudiendo ser divididas claramente en dos tipos. En R. leguminosarum la simbiosis ocurre en hospederos como el trébol, frijol y chícharo dependiendo del biovar al que pertenecen (trifoli, phaseoli o viciae respectivamente) puesto que contienen diferentes pSim que codifican distintas especificidades para nodulación. Para el caso de R. galegae éste reconoce a dos especies distintas del mismo género Galegae officinalis y G. orientalis. Por último, está el caso de las cepas que no han sido clasificadas taxonómicamente, como la MPIK-3030 y la NGR-234. De esta última Young (1991) reporta que tiene la capacidad de establecer simbiosis con 19 especies distintas de plantas pertenecientes a cinco familias.

En Rhizobium han sido definidos diferentes grupos de bacterias basados en caracteres cromosomales y de acuerdo a las similitudes del rRNA 23S reconociéndose tres grupos (Martínez, et al., 1990):

GRUPO 1

R. melilotiR. leguminosarum

bv. trifolii

bv. phaseoli

bv. viceae

R. fredii

GRUPO 2

R. loti

GRUPO 3

R. galegaeBradyrhizobium (SUS
ESPECIES)B. japonicum

Sin embargo, se ha establecido la existencia de una enorme diversidad entre las bacterias del biovar phaseoli por diferentes criterios como el patrón de proteínas, resistencia antibióticos, tipo serológico, electroferotipo de enzimas, hibridización DNA-DNA, perfil de plásmidos y estructura de exopolisacáridos, caracterizándolo como un grupo genéticamente heterogéneo.

Así, a partir de los estudios de una gran colección de aislados nativos de nódulos de Phaseolus vulgaris (frijol) Martínez, et al (1985) han distinguido dos especies de Rhizobium con las siguientes características:

- 1) R.1. bv. phaseoli constituido por las cepas más abundantes, con reiteración de los genes nifH y un estrecho espectro de hospedero, estableciendo simbiosis con P. vulgaris principalmente y P. coccineus. Cabe señalar que el patrón de restricción con la enzima BamHI permite separar a éstas cepas en cinco Tipos de acuerdo al tamaño de las

reiteraciones nifH. Vázquez, et al (1991) han establecido que esta especie posee un arreglo particular de los genes comunes de nodulación, donde el gen nodA se encuentra separado de los genes nodBC formando dos unidades transcripcionales distintas con una regulación coordinada. Además, este grupo posee el gen psi, el cual interviene en la regulación de la síntesis de exopolisacáridos (Borthakur, et al., 1985).

- 2) Rhizobium tropici la cual tiene dos subgrupos que corresponden a las cepas tipo IIA y IIB (Martínez, et al., 1991) que se caracterizan por carecer de reiteraciones nifH y presentar un amplio espectro de hospederos formando nódulos con P. vulgaris, Leucaena leucocephala, Pachyrhizus erosus y varias leguminosas tropicales; los genes nodABC están arreglados en un operón al igual que en otras bacterias de Rhizobium y Bradyrhizobium (Vargas, et al., 1990), y no hibridizan con el gen psi.

EL GENOMA DE Rhizobium

Las bacterias de este género tienen la información genética necesaria para dirigir, en coordinación con la planta, la formación de un nódulo fijador de nitrógeno. De esta manera, algunos genes involucrados en este proceso han sido caracterizados como son los genes de: nodulación (nod); fijación de nitrógeno (nif y fix); exopolisacáridos (exo, psi, psr y pss);

síntesis de B-glucano (ndv); lipopolisacáridos (lps); especificidad de huésped (hsn); y síntesis del grupo hemo (hem). Una característica relevante del genoma de Rhizobium es el alto contenido de información genética presente en plásmidos (25 al 35%) los cuales varían en número de uno a ocho dependiendo de la cepa. Además en el pSim se localizan los genes nod, nif y fix (que varían desde 120kb hasta 1600kb) a excepción de B. japonicum y A. ccculinodans donde estos genes se encuentran en el cromosoma.

Así, el papel del cromosoma consiste en proveer el ambiente genético y fisiológico necesario para que los pSim funcionen como una poza genética accesoria para el crecimiento prototrófico pero indispensable para la simbiosis. Sin embargo el hallazgo de otros plásmidos diferentes al pSim que pueden alterar aspectos importantes del proceso simbiótico, plantea la posibilidad de coevolución de diferentes plásmidos. Al respecto, Charles y Finan (1991) han encontrado en plásmidos funciones consideradas como esenciales, involucradas en transporte de dicarboxilatos, síntesis de exopolisacáridos, lipopolisacáridos y de tiamina. Brom, et al (1992) reportan en R.l. bv. phaseoli la participación de un plásmido diferente al pSim en la síntesis de lipopolisacáridos y señala además la importancia de otros plásmidos para el crecimiento en vida libre y también para competitividad en nodulación.

Una segunda característica del genoma de Rhizobium es la abundancia de secuencias reiteradas, estimada en 700 elementos reiterados pertenecientes a 200 familias distintas. (Flores, et

al., 1987) como son las secuencias de inserción y reguladores, la región fix, los genes nod y nif, etc. Este nivel de reiteración es poco frecuente en procariotes, únicamente en Halobacterium (Sapienza, et al., 1982) y Streptomyces (Hasegawa, et al., 1985) han sido demostrados niveles tan altos de reiteraciones.

En R.1. bv. phaseoli las familias reiteradas están presentes tanto en el cromosoma como en plásmidos específicos, otras se distribuyen entre diferentes plásmidos o entre plásmidos y al cromosoma. Independientemente de su papel funcional, los elementos repetidos pueden participar en la plasticidad interna del genoma, al permitir recombinación homóloga produciendo rearrreglos genómicos con alta frecuencia (Flores, et al., 1987, 1988).

La tercera característica del genoma de Rhizobium es la gran cantidad de rearrreglos genómicos, como son la alta frecuencia de variantes afectadas en sus capacidades simbióticas (Labandera y Vincent, 1975; Mathis, et al., 1986; Weaver y Wright, 1987), el incremento de la frecuencia de obtención de variantes y curación de plásmidos por el incremento de la temperatura (Zurkowski, 1982), la transposición de secuencias de inserción hacia regiones involucradas en el proceso simbiótico (Ruvkun, et al., 1982) y la generación de la inestabilidad simbiótica por las secuencias reiteradas (Kaluza, et al., 1985).

Flores, et al (1988) han detectado en R.1. bv. phaseoli frecuentes rearrreglos genómicos bajo condiciones de laboratorio, ocurriendo deleciones de algunos de los elementos a una frecuencia de 10^{-2} a 10^{-3} . Para B. japonicum USDA110, las deleciones

tienen sus sitios de entrecruzamiento entre secuencias reiteradas en el cromosoma localizadas alrededor de la región nif (Kaluza, et al., 1985) y en R. meliloti 1021 la ISRM1 transpone preferencialmente a la región nif a una frecuencia de 10^{-3} (Ruvkun, et al., 1982).

Soberón-Chávez, et al (1986) reportaron en R. l. bv phaseoli la presencia de cepas incapaces de nodular al perder las tres regiones nifH existentes a una frecuencia del 1%. Estas cepas no presentan alteración aparente en el patrón plasmídico, pero tienen una pérdida de al menos 80 kb adicionales localizadas en el pSim (Soberón-Chávez, et al., 1991a). El modelo propuesto es una delección acompañada de una amplificación de la parte restante del pSim, por recombinación entre secuencias reiteradas. Sin embargo la evidencia presentada en sus trabajos resulta insuficiente para sustentar su modelo (Soberón-Chávez, et al., 1989; 1991 b).

Mientras la dinámica interna ha jugado un papel importante en la estructura del genoma de Rhizobium la introducción de elementos genéticos externos permite reconocer también esta dinámica. Brewin, et al (1982) y Christensen y Schubert (1983) al introducir un pSim en una cepa R. leguminosarum, obtuvieron un plásmido híbrido por recombinación entre el pSim entrante y el residente. En otros ejemplos dos pSim's pueden coexistir, pero rearrreglados o con alteraciones fenotípicas después de pasar por planta (Djordjevic, et al., 1982; Sadowsky y Bohlool, 1985).

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVO DEL TRABAJO

Por lo anteriormente descrito se deduce que el genoma de Rhizobium posee alto grado de plasticidad. Cabe señalar que los elementos de la familia reiterada nif se caracterizan por mantener una gran identidad entre ellos y debido a su importancia en la fijación simbiótica del nitrógeno, resulta de interés el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la dinámica de esta familia.

El plásmido simbiótico de las especies de Rhizobium es la estructura que lleva los genes de la nitrogenasa (nif) así como los genes que determinan varios pasos en el proceso de nodulación (nod). Estos genes están estrechamente ligados con separaciones de 10 a 20 Kb, lo cual contrasta con B. japonicum donde los genes correspondientes están localizados en el cromosoma.

En particular, el pSim de la cepa de R. l. bv. phaseoli CFN-42 es una estructura circular de 390 kb, que contiene cerca de 85 fragmentos de restricción BamHI, en el cual hay cerca de 10 familias de elementos reiterados, una de ellas está compuesta de las tres regiones diferentes (a, b y c) que poseen los genes nifH (Quinto, et al., 1982; Dávila, et al., 1988), los cuales presentan homología total entre las tres regiones (Quinto, et al., 1985).

Las regiones a y b tienen homología por 5 kb y mantienen organizado como un operón los genes estructurales de la nitrogenasa con la dirección de transcripción nifH-nifD-nifK (Quinto, et al.,

1985; Segovia, 1988) como ocurre en Klebsiella pneumoniae, R. meliloti, R. trifoli y R. leguminosarum. Cabe señalar que en B. japonicum el gene nifH se encuentra separado de los genes nifDK (Scott, et al., 1983). Particularmente, en R. l. bv. phaseoli la región c contiene solamente a nifH y mantiene una homología de 1.3 Kb con las regiones a y b, recientemente Valderrama (1989) y Valderrama, et al (1992) reportaron en la región c hibridización positiva con un detector nifD de R. l. bv. phaseoli, que corresponde a la región amino terminal de NIFD.

Al analizarse en R. l. bv. phaseoli el comportamiento en cada uno de los tres genes nifH (Morett, et al., 1988) demostraron que la actividad de estos genes esta regulada en las regiones a y b mientras que en la región c la expresión no fue claramente demostrada porque las cepas presentaron rearrreglos a muy alta frecuencia. Romero, et al (1988) reportaron en R. l. bv. phaseoli que las regiones a y b que llevan los operones nifHDK, son necesarias para la fijación óptima de nitrógeno en Phaseolus vulgaris, indicando un efecto de dosis génica para estas reiteraciones y en cambio la región c por sí sola fue incapaz de realizar la fijación de nitrógeno.

Martínez, et al (1985; 1991) han demostrado que la reiteración de los genes estructurales de la nitrogenasa es compartida por todos los aislados como R. l. bv. phaseoli y no es una característica compartida con los recientemente clasificados como una especie nueva, denominada Rhizobium tropici.

La reiteración de los genes nifH no es una característica exclusiva de R. l. bv. phaseoli, debido a que se han encontrado

este tipo de secuencias reiteradas en Anabaena, Azotobacter, Calotrix, Clostridium, Frankia, Rhodopseudomonas y varias cepas de Rhizobium (Long, 1989b).

Estas secuencias reiteradas tienen consecuencias importantes para la plasticidad interna del genoma de Rhizobium, puesto que en Escherichia coli y Salmonella typhimurium se ha reportado que la recombinación entre pares de elementos idénticos, cualquiera de ellos, sean secuencias de inserción o no, pueden producir inversiones, adiciones, deleciones y amplificaciones de grandes segmentos, dependiendo de su tamaño y orientación de las secuencias.

Al respecto Romero, et al (1991) han detectado amplificaciones y deleciones de una región del plásmido simbiótico de R. l. bv. phaseoli CFN-42, generadas éstas por recombinación entre los genes nifH de las regiones a y b. Esto se observa al integrar en el gene nifH de la región c, el cassette GDYN1 que confiere sensibilidad a sacarosa y resistencia a kanamicina, que depende de la dosis génica. Los rearrreglos más frecuentes fueron los eventos de amplificación obteniéndose duplicaciones y triplicaciones a una frecuencia de 10^{-3} . Independientemente del grado de amplificación la reversión al pSim original fue de 10^{-2} . En el caso de las deleciones, éstas se seleccionaron por resistencia a sacarosa presentándose a una frecuencia de 10^{-4} (Fig. 1).

Romero, (1991) reporta que estos rearrreglos son generados principalmente por recombinación entre las reiteraciones nifHDK localizadas en orientación directa pero además pueden usarse

otros elementos repetidos a menor frecuencia como sitios de recombinación en el pSim. A su vez Martínez-Salazar (1991) demostró que los eventos de amplificación y delección son dependientes de recA, ya que en un fondo carente de recA la frecuencia de los eventos disminuyen al menos cien veces.

Hasta el momento Romero, et al (1991) han propuesto que los mecanismos que pueden operar en el pSim de R.1. bv phaseoli CFN-42 para la generación de plasticidad son: por entrecruzamiento desigual o por la de excisión de una molécula circular por recombinación entre secuencias repetidas y su posterior reinserción en un pSim íntegro (Fig. 2). Al respecto, Durán (1991) sugiere que para los fenómenos de amplificación en R.1.bv. phaseoli CFN-42, el mecanismo que esta operando en la generación de rearrreglos es el de excisión y reinserción de moléculas circulares.

Cabría preguntarse si los rearrreglos analizados en el plásmido simbiótico de R.1. bv. phaseoli CFN-42 pueden ocurrir en el pSim de otras cepas. La evidencia originada del estudio de genética de poblaciones sugiere que la especie de R.1. bv. phaseoli este constituida por cinco linajes cromosomales (Piñero, et al., 1988). De tal manera, resulta de interés estudiar los mecanismos de amplificación y delección por recombinación entre los genes nifH de algunas de las cepas de R.1. bv. phaseoli representantes de cada linaje (Fig. 3) para establecer si estos rearrreglos son una estretegia generalizada entre los plásmidos simbióticos.

Por lo tanto los objetivos de esta investigación son:

1. Generar derivadas de distintas cepas de R.1. bv. phaseoli con inserciones del cassette GDYN1 en cada una de las reiteraciones nifH del plásmido simbiótico.
2. Evaluar la frecuencia de generación de rearrreglos, amplificaciones y deleciones en el pSim de cada una de estas cepas.
3. Determinar el o los mecanismos involucrados en la generación de estos rearrreglos en el pSim.
4. Estimar, en base a la resolución de los objetivos anteriores, que tan generales son los mecanismos encontrados en el pSim de R.1. bv. phaseoli CFN-42.

ESTRATEGIA ESPERIMENTAL.

Con el fin de generar en las cepas seleccionadas de R.1.bv.phaseoli inserciones del cassette GDYN1 en cada una de las reiteraciones nifH; se procedió a realizar las cruzas entre las cepas de Rhizobium y E. coli S17-1 que contiene clonado el cassette GDYN1 en el plásmido suicida pDR20 (Fig. 4).

Después se seleccionaron las cruzas en el medio selectivo y (Fig. 5), los marcadores de las células transconjugantes se verificaron por la técnica de picado en réplica. Primeramente para asegurarnos de la pérdida del vehículo de clonación, la selección de las cepas resistentes se hizo en tetraciclina y

para garantizar la presencia del cassette GDYN1 en alguna de las reiteraciones nifH se picaron en las concentraciones de los marcadores elegidos para cada cepa (espectinomicina o gentamicina). A su vez, se seleccionaron las transconjugantes que tuvieran resistencia a los distintos marcadores kanamicina y estreptomycin, para excluir mutaciones que confieran alta resistencia al marcador elegido (Fig. 5).

Una vez identificadas las cepas por los marcadores, se procedió a realizar el análisis de perfil de plásmidos y el aislamiento de DNA total; para caracterizarlas mediante la hibridización con los detectores de nifH, del cassette GDYN1 y del vehículo de clonación (Fig. 6).

Con las cepas ya construidas (nifH:GDYN1), se procedió a seleccionar cepas con amplificación por resistencia al aumento en antibiótico (dosis génica) y las cepas con eventos de deleción se determinaron por resistencia a sacarosa (Fig. 5).

MATERIALES Y METODOS

CEPAS

Las cepas utilizadas de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli se localizan en el dendograma de la Fig. 3, indicando la distancia genética entre ellas y en la tabla I se presentan algunas de las características distintivas de cada Tipo de cepa. La cepa de Escherichia coli S17-1 se caracteriza por ser recA⁻ y tener integrado cromosomalmente los genes tra del plásmido RP4, por lo cual es usada como hospedero del plásmido suicida pDR20 (Fig. 4), para la transformación conjugativa a las cepas de Rhizobium. El plásmido pDR20 contiene clonada la región nifHa de R.l. bv. phaseoli CFN-42 y en el codón 147 de la secuencia nucleotídica se encuentra insertado el cassette de 5.7 kb denominado GDYN1 (Romero, et al. 1991). El cassette posee los genes de Bacillus subtilis; sacB que codifica para la enzima levansucrasa involucrada en la síntesis de leván y la hidrólisis de la sacarosa (Gay, et al., 1983) y sacR que es un locus regulador que funciona como un atenuador (Steinmetz, et al., 1985). Además el cassette posee los genes que confieren resistencia a estreptomomicina (Sm), espectinomomicina (Sp), kanamicina (Km), gentamicina (Gm) y tobramicina (Tm).

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para el cultivo de las cepas de R.1. bv phaseoli se empleó el medio PY (Noel, et al., 1984) consistente en 0.5% de peptona de caseína y 0.3% de extracto de levadura disueltos en agua bidestilada y autoclaveados durante 20 minutos. Posteriormente se le añadió cloruro de calcio a una concentración final de 7 mM. En caso de requerir el medio sólido se agregó agar bacteriológico al 1.5%. Las cepas en este medio se incubaron en períodos de 16 horas para cultivos líquidos o en intervalos de 2 a 4 días según las condiciones de selección a 30°C en medios sólidos.

La cepa de E. coli se cultivó en el medio de Luria (Miller, 1972) que contiene 1% de peptona de caseína, 0.5% de extracto de levadura, 1% de cloruro de sodio disueltos en agua bidestilada y esterilizados. Se adicionó 1.5% de agar bacteriológico para preparar los medios sólidos. La cepa en este medio se incubó de 18 a 24 horas a 37°C.

Cuando fue necesario, a los medios ya esterilizados se adicionaron los antibióticos (SIGMA) en las siguientes concentraciones: kanamicina 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, estreptomycinina 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, espectinomycinina 50, 100, 800 y 1000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, ácido nalidixico 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ y 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, gentamicina 5, 40, 50, 80 y 90 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, tetraciclina 2 y 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ y cloramfenicol 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

La producción de melanina en R.1. bv. phaseoli fue hecha de acuerdo a Lamb, et al. (1982) con las siguientes modificaciones; las colonias fueron crecidas en medio PY suplementadas con CuSO_4

20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y L-tirosina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Después de 4 días de crecimiento, las colonias fueron lisadas al colocarles encima un filtro de papel Whatman 3MM embebido en SDS al 10%.

CONJUGACION

Se cultivaron toda la noche 5ml de las cepas donadora y receptora hasta su fase estacionaria, se tomó una alícuota de 3ml para su centrifugación (Centrifuga Beckman Modelo TJ-G) por 10 minutos a 7000 rpm, el sobrenadante se decantó y la pastilla celular fue resuspendida (Vortex Genie 2, Fisher Brand) en 3ml de una solución de MgSO_4 10mM.

Se tomaron 25 μl de cada una de las cepas y se platearon separadamente los controles en cajas de Petri con medio PY. Para las cruces se colocaron 100 μl de la cepa receptora (Rhizobium) al centro de la caja y encima se adicionaron 50 μl de la cepa donadora (E. coli) procediendo al plateo de la mezcla, las cajas plateadas se incubaron a 30°C por 24 horas.

Para cosechar las células se adicionó a las cajas de Petri una solución de MgSO_4 10mM + Tween 0.01%, con un ml para los controles y 3ml para las cruces. Posteriormente se tomó el concentrado celular realizando las series de dilución (10^0 a 10^{-8}) y se colocaron en el medio selectivo a fin de evaluar sus cuentas viables. Los marcadores de las células transconjugantes se verificaron por la técnica de picado en réplica.

DETECCION DE PLASMIDOS

La técnica empleada para la visualización de los plásmidos fue la de ECKHARDT (1978). Se crecieron las células hasta la fase exponencial temprana (aproximadamente entre una densidad óptica de 150 a 200 kletts) se tomó una alícuota de 1ml y se centrifugó (centrífuga Eppendorf Modelo 5412). El medio se decantó y la pastilla celular se resuspendió en 1ml de Sarcosyl 0.1% (Lauryl-sarcosinato) en TE50/20 (Tris HCl 50mM y EDTA 20mM a pH8), centrifugándose de nuevo. El sobrenadante se decantó y se lavó la pastilla en 0.5ml de TE 50/20 volviendo a centrifugar, se eliminó todo el líquido y la pastilla celular se congeló por 10 minutos a -20°C .

Posteriormente la pastilla se resuspendió sucesivamente en 40ul de la solución A (lizosima 7500u/ml, RNasa 0.3u/ml, azul de bromofenol 0.05%, xilene cianol 0.05% y ficoll 400000 al 20% disueltos en una solución de TB1X (Tris 89mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2.0mM a pH8) dejándose incubar 10 minutos a temperatura ambiente. La suspensión generada se depositó en los pozos de un gel de agarosa 0.7% en TB 1X (150mm X 150mm X 3mm) y se añadieron 40ul de la solución B (dodecylsulfato de sodio-SDS 0.2% y Ficoll 400000 al 10% en TB1X) y se mezclaron cuidadosamente las dos soluciones. Posteriormente se añadieron 100ul de la solución C (SDS al 0.2% y Ficoll 400000 al 5% en TB1X) sin mezclar y por último se sellaron los pozos con la misma agarosa con la que se hizo el gel dejando entre 10 a 20 minutos a 4°C .

Se inició la electroforesis con una corrida de una hora a

8mA constantes y 4 horas a 170volts constantes, al final de la corrida los geles se tiñeron 15 minutos con una solución de bromuro de etidio 5 μ g/ml, se enjuagaron con agua bidestilada durante 20 minutos y se fotografiaron sobre una lámpara de luz ultravioleta (FOTODYNE) con película polaroid 55.

AISLAMIENTO DE DNA TOTAL

Se tomó una azada de la cepa requerida y se colocó en 5 ml de medio líquido incubándose toda la noche. Las células se cosecharon en la fase estacionaria por centrifugación a 10000 rpm y se lavaron con un ml de una solución de TE50/20, resuspendiéndose la pastilla en 400ul de TE50/20. Posteriormente se adicionaron 50ul de pronasa (PROTEASA K 2.5mg/ml predigerida una hora a 37°C) y se mezcló por inversión suave; se añadieron 50ul de SDS 10% disuelto en TE50/20 pH8 mezclando suavemente y se incubó una hora a 37°C. La mezcla se pasó por jeringa insulínica 5 veces.

Acto seguido se extrajo la mezcla 3 veces con una solución de F:C:1 (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, 24:24:1) y dos veces con cloroformo. Se precipitó el DNA agregando 1/25 del volumen total de NaCl5M y 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto frío, agitando suavemente. Se precipitó el DNA por una hora a -20°C y luego se centrifugó obteniéndose una pastilla de DNA, la cual se lavó tres veces con etanol al 70% y se secó en una

microfuga equipada con vacío (Savant). El DNA se resuspendió en 40 μ l de TE10/1 (Tris HCl 10mM y EDTA 1mM a pH8) y se añadieron 10 μ l de una solución de RNasa (10mg/ml en TE10/1 hervida por cinco minutos) incubándose una hora a 37°C.

Se tomaron 4 μ l de la muestra y se comprobó la concentración del DNA en un gel de agarosa 1% en TA IX (TA 10X es Tris 0.4M, 114.2ml de ácido acético glacial y EDTA 0.5M a pH8) y se realizó la electroforesis durante una hora a 90 volts constante. Se obtienen aproximadamente 60 μ g de DNA.

CONDICIONES DE DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICION

El DNA fue digerido con la endonucleasa BamHI. Las condiciones para la digestión fueron 5 μ g de DNA, 5 unidades de enzima por μ g de DNA, solución amortiguadora de reacción E61X (E610X es Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 7mM y β mercapto etanol 7mM disueltos en agua HPLC a pH8) y agua HPLC para aforar.

La reacción se mezcló en vortex 5 segundos y se dió un pulso de 15 segundos en centrífuga. La digestión se realizó en horno de microondas al máximo nivel dando 5 pulsos de 10 segundos a intervalos de 3 minutos. Para checar la digestión se tomaron 4 μ l de la reacción y se colocaron en un gel de agarosa al 1% en TAIX y se realizó la electroforesis a 70volts constante durante una hora.

ELECTROFORESIS DE DNA TOTAL (Maniatis, et al. 1982)

El DNA previamente digerido se analizó en geles de agarosa al 1% en TAIX. La cantidad aplicada a cada carril fue de 1 µg de DNA mezclado con el colorante M/M (ficoll 400000 al 15%, azul de bromofenol al 0.25% y xilencianol al 0.25% disueltos en agua HPLC) y agua HPLC. La corrida se realizó en cámaras de electroforesis (Hoefer Scientific Instruments, SE 600) con TAIX a 30V, constantes durante 12 a 16 horas. Los geles se tiñeron durante 15 minutos con la solución de bromuro de etidio (5µg/ml) enjuagándose con agua bidestilada 20 minutos y se fotografiaron sobre una lámpara de luz ultravioleta (FOTODYNE) con película Polaroid 55.

TRANSFERENCIA DEL DNA DE UN GEL A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

La transferencia del DNA se realizó de acuerdo a la técnica de Southern (1975) que consiste en el tratamiento del gel en tres soluciones a 4°C, se realizaron dos veces los lavados en cada solución. Primeramente se trató en una solución de HCl 0.25M en agitación durante 10 minutos, cada vez, se decantó; se vertió en seguida una solución de NaOH 0.5M NaCl 1.5M en agitación durante 20 minutos, cada vez, se decantó y por último se añadió la solución de TrisHCl 0.5M, NaCl 1.5M a pH7.4 en agitación durante 30 minutos, cada vez.

Las membranas de nitrocelulosa (HYBOND-C EXTRA, Amersham) se hirvieron por 10 minutos en agua destilada y se enjuagan en una

solución de SSC6X (SSC20X es citrato de sodio 1.5M y NaCl13M).

Para realizar la transferencia del DNA bidireccionalmente (sandwich), se colocó un paquete de 7 toallas de papel absorbente, encima se pusieron 2 filtros de papel Whatman 3MM enjuagados en SSC6X a la vez se colocó la membrana de nitrocelulosa y arriba de esta se puso el gel tratado, se realizó el mismo procedimiento en orden invertido y al final se colocó un peso de 500gr. Durante 12 horas se dejó que el DNA se transfiriera por capilaridad a las membranas.

Al sacar la transferencia se enjuagaron las membranas en SSC6X, se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente el DNA se fijó a las membranas por incubación durante dos horas a 80°C en un horno equipado con vacío (Labline DuoVac Oven).

HIBRIDIZACION

a) Detectores.

Los plásmidos usados como detectores se presentan en la Fig. 6 ; fueron el pSUP202 (Simon, et al. 1983) el pGUS3 (Romero, et al. 1991) y el p15b (Valderrama,1989). Además se seleccionaron 11 cósmidos (Fig. 7) que dan una cobertura completa del pSym de la cepa CFN42 (Girard, et al. 1991).

b) Marcaje Radioactivo.

Los detectores se marcaron radioactivamente por el método de Rigby, et al (1977). Se tomaron 200 ng del DNA a marcar, incubándose con una mezcla de deoxiribonucleótidos fríos, ^{32}P -deoxiCTP y la enzima DNA polimerasa I y Agua HPLG para aforar. La reacción se incubó por dos horas a 14°C (Hotpack-baño circulador refrigerado).

La marca incorporada se separó de la marca libre mediante una columna de sephadex G75 (7cm X 0.5cm) adicionando la solución amortiguadora de columna (Tris 10mM, NaCl 100mM, EDTA 1mM y SDS 0.1%)

Se recuperaron 600 μl radioactivos, de los cuales se tomó una alícuota de 5 μl y en un detector de radiaciones beta (Probe count, Oncor) se cuantificó la marca incorporada.

c) Hibridización.

Las hibridizaciones fueron hechas en Hornos Hybaid Oven en condiciones de alta severidad, las cuales permiten un 90-100% de homología (bajas concentraciones de sales y alta temperatura).

La solución empleada para las mezclas de prehibridización e hibridización fue la siguiente: Denhardt 10X (Denhardt 100X es 2% Ficoll, 2% BSA (seroalbumina bovina), 2% PVP (polivinil pirrolidina) en agua HPLC, amortiguador de fosfatos 0.1M (Fosfatos 1M es $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5M- Na_2HPO_4 0.5M a

pH6.7) SSC5X, DNA desnaturalizado de esperma de salmón 100 µg/ml y agua HPLC.

Las membranas se prehibridizaron durante 12 horas a 65°C. Al finalizar, se decantó la mezcla de prehibridización y se adicionó la mezcla de hibridización, la cual contiene el detector marcado radioactivamente; se hibridizó durante 12 horas a 65°C. Al cabo de éstas, se lavaron las membranas para eliminar el exceso de marca radiactiva, primeramente se desechó la mezcla de hibridización y se adicionaron 10ml de una solución de SSC2X-SDSO.1% se agitó vigorosamente diez segundos y se decantó. Se añadieron 500ml de la misma solución y se lavaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. El segundo lavado se realizó con la solución de SSC0.1X-SDSO.1% a 55°C durante 30 minutos, repitiéndose este procedimiento cuatro veces y por último se lavaron dos veces en una solución de SSC0.1X por 15 minutos.

Las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se hornearon 10 minutos a 65°C, se colocaron en papel y se forraron con envoltura adherente para después montarlas en cassettes para autorradiografía.

d) Autorradiografía.

En los cassettes para autorradiografía con pantallas intensificantes se colocaron placas de radiografía Kodak (X Omat K) sobre las membranas hibridizadas y la radiografía se llevó a cabo a -70°C en un REVC0 (Kelvinator Serie 100) y

se expusieron durante un período de 12 horas a una semana.

ANALISIS DE PERFILES DE HIBRIDIZACION POR DENSITOMETRO.

La intensidad de las señales de hibridación detectadas en una placa de autorradiografía se visualizan como bandas y dependen de la cantidad de marca hibridada en la secuencia específica y estas a su vez son un reflejo del número de copias de la banda en el genoma.

Así para evaluar el número de copias de una banda con respecto a otras bandas en un carril de una autorradiografía se utilizó un densitómetro de barrido GS300 y el sistema de análisis de datos GS350 de Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, Ca.).

MAPEO DE LAS DELECCIONES

La estrategia a seguir para realizar el mapeo de las deleciones encontradas fue mediante las hibridaciones con los cósmidos del pSim de R.1. bv. phaseoli CFN42 (Fig. 7) bajo los siguientes criterios:

- 1) Los cósmidos del pSim de la cepa CFN42 contienen 390 kb. Los plásmidos simbióticos de las cepas analizadas son más grandes (460 kb, 510 kb y 573 kb) por lo tanto es posible que no se haya evaluado la totalidad de la información con-

tenida en ellos al utilizar éstos cósmidos como detectores.

- 2) Localización de los cósmidos en los cuales hubo pérdidas de bandas.
- 3) Localización de los cósmidos que no perdieron bandas.
- 4) Este primer ordenamiento nos permitió caracterizar de manera general a los pSim indicando que la zona deletada en las cepas analizadas comprendió a los cósmidos cGD7, 101, 28, 15 y 45 (Fig. 8) ubicado entre las regiones de los operones nifHDK.
- 5) Para realizar el análisis del mapeo banda por banda de las deleciones, se tomó como guía a la deleción mayor, considerando:
 - a) las bandas que se revelan en los cósmidos deletados se localizan en la parte que no participó en la deleción.
 - b) la presencia de bandas tenues entre dos bandas intensas se consideraron reiteraciones del DNA y no se tomaron en cuenta para el análisis.
 - c) por comparación con la cepa parental y las otras deleciones se establecieron las bandas comunes del cósmido y su ordenamiento se realizó por eliminación.
- 6) Al realizar las comparaciones, se consideró la concentración del DNA por carril, pues un exceso del DNA en un carril revelaría bandas tenues que no son observadas en las otras deleciones.

- 7) La presencia de una banda nueva corresponde a:
- a) sitio de recombinación (banda híbrida)
 - b) bandas tenues que no se veían antes, son el resultado de una replicación mayor del plásmido simbiótico en la cepa que ahora revela reiteraciones.

RESULTADOS

¿OCURREN LOS REARREGLOS MAS FRECUENTES DEL pSim de R.1. bv. phaseoli ENTRE LAS REITERACIONES nifH?

Recientemente se ha demostrado que la mayor frecuencia de los rearreglos en el pSim de R.1.bv. phaseoli CFN-42 ocurren entre las regiones nifH aun y cuando se pueden utilizar en menor medida otras secuencias reiteradas, posiblemente menos extensas para producirlos. Para investigar la posibilidad de que la plasticidad del pSim generada por las reiteraciones nifH sean una característica común en las cepas de R.1.bv.phaseoli se seleccionaron cinco cepas perteneciendo a cinco de los linajes descritos por Piñero, et al (1988).

Considerando que en el pSim de la cepa CFN-42, los operones nifHDK en las regiones a y b comparten homología por 5 kb ofrecen un sustrato adecuado para recombinar cuando el cassette GDYNI está insertado en la región nifHc. Sin embargo, en la medida que el cassette GDYNI esta insertado en la región nifHb la región accesible para recombinar es disminuida a 3.8 kb y en el caso que el cassette GDYNI se encuentre en la región nifHa la porción de DNA susceptible para recombinar queda reducida a 1 kb, de tal forma que al ir restringiendo parcialmente las regiones para recombinar entre los genes de la nitrogenasa en el plásmido se favorece a que otras secuencias internamente reiteradas puedan ser usadas como sitios para recombinar amplificando o deletando

distintas regiones del pSim.

CONSTRUCCION DE LAS CEPAS R.1. bv. phaseoli CON EL CASSETTE GDYNI EN LOS GENES nifH

La construcción de las cepas de R.1. bv. phaseoli con el cassette GDYNI en las regiones de los genes de la nitrogenasa fue variable ya que depende de la homología entre las secuencias nifH del pSim de la cepa elegida y de nifHa::GDYNI del pDR20, además de que algunas de las cepas pertenecen a distintos tipos de reiteración nifH.

Las cepas del Tipo I presentaron una mayor aceptación del cassette GDYNI. Para la cepa TAL-182 se obtuvieron 4374 transconjugantes de las cuales 13 fueron dobles recombinantes (0.32%) obteniéndose un total de 10 inserciones en nifHa, 1 en nifHb, 1 en nifHc y una delección nif-nif. En la cepa NITRAGIN-8251 se aislaron 11137 transconjugantes, 10 fueron dobles recombinantes (0.12%) con el cassette insertado sólo en las regiones nifHa(7) y nifHb(2), además se detecto una delección nif-nif.

En la cepa CIAT-894 del Tipo II se obtuvieron 37 transconjugantes y se aisló una doble recombinante (2.75%) con el cassette en nifHa.

Para el caso de las cepas BRASIL-5 Tipo III y F-14 Tipo IV se obtuvieron 1824 y 2411 transconjugantes respectivamente; 5 cepas de la BRASIL-5 y 8 cepas de la F-14 se seleccionaron por marcadores como dobles recombinantes. Sin embargo, al hibridizar

con el detector pSUP202 se observó una señal positiva en la región nifHa al igual que con los detectores pGUS3 y p15b (Fig. 6). Dado que para las cepas BRASIL-5 y F-14 sólo se obtuvieron recombinantes sencillas, a partir de éstas se procedió a buscar los fenómenos de delección, puesto que para las amplificaciones ocurriría el aumento en número de copias arreglado en tandem de nifHa-vector-nifHa::GDYN1 de manera similar a lo reportado para R.1. bv. phaseoli CFN-42 (Durán, 1991).

CEPAS DEL TIPO I: TAL-182 Y NITRAGIN-8251

AMPLIFICACIONES

En la cepa TAL-182 se obtuvieron los eventos de amplificación al seleccionar con gentamicina a 90 ug/ml. Se analizaron 4 derivadas en el caso de la inserción del cassette GDYN1 en la región nifHc y 5 derivadas de cada una de las inserciones del cassette en las regiones nifHa y nifHb. En todos los casos los sitios de recombinación utilizados para producir amplificaciones fueron las regiones nifH (Fig. 9). Sin embargo la frecuencia a la cual ocurrió este evento fue variable dependiendo en donde se insertó el cassette GDYN1.

En la Tabla II observamos que para la cepa TAL-182 la inserción en nifHb presentó la mayor frecuencia de amplificación, siendo 2 veces mayor que los eventos con el cassette en la región nifHc y estos últimos a su vez fueron 46 veces más frecuentes que las amplificaciones con el cassette en la región

nifHa. Cabe señalar que estas diferencias son muy grandes para atribuir las solamente a la reducción de la zona de recombinación, por lo que es probable que otros factores estén participando.

Para la cepa NITRAGIN-8251 los eventos de amplificación se obtuvieron al seleccionar con gentamicina a 50ug/ml o en espectinomycinina a 800ug/ml. Así, para realizar el análisis de las cepas con el cassette GDYN1 insertado en la región nifHa y nifHb se escogieron 7 cepas derivadas para cada inserción. En ambos casos el fenómeno de la amplificación sucedió por recombinación entre las regiones nifHa y nifHb (Fig. 9). Pero como se observa en la Tabla II para la cepa NITRAGIN-8251 la frecuencia a la cual ocurren estos eventos fue 47 veces menor al encontrarse el cassette en nifHa, esta diferencia es mucho mayor a lo esperado por la reducción en la zona accesible para recombinar de manera que posiblemente otros factores estén actuando para producir esta disminución de la frecuencia de los rearrreglos.

La única inserción del cassette GDYN1 en la región nifHc se obtuvo en la cepa TAL-182 (Fig.9; carril 4) se analizaron las cepas seleccionadas para amplificaciones por el perfil de plásmidos, hibridización contra los detectores p15b, pGUS3 (Fig. 6) y los cósmidos que cubren el pSim de la cepa CFN-42 (Fig. 7) El análisis con el detector específico de nifH nos indica el patrón característico de bandas para una cepa amplificada cuando el cassette esta en la región nifHc (Fig. 9, carril 10) donde se esperan cuatro bandas: nifHc::GDYN1 (9.5 kb), nifHa (9.0. kb), nifHb (5.6 kb) y una banda híbrida nifH 5'b/3'a (5.2 kb). Debido a la baja resolución del gel entre las bandas de nifHb y nifH

5'b/3'a, no permite una buena separación en esta zona. Así, al realizar la densitometría para calcular el número relativo de copias se encontró la proporción característica de tres bandas que corresponde a la relación 2:1:2. Tomando en cuenta la anterior para la cepa analizada TAL-182 nifHc::GDYN1 se obtuvo una proporción de bandas de 7:1:7 mostrando claramente que se trató de una septuplicación de la región entre nifHa y nifHb (Fig. 9; carril 10).

En las cepas TAL-182 nifHb::GDYN1 y NITRAGIN-8251 nifHb::GDYN1 (Fig. 9; carriles 3 y 13) los perfiles de plásmidos obtenidos por Eckhardt se hibridizaron con los distintos detectores mencionados anteriormente para determinar si los rearrreglos son aún causados por recombinación entre las reiteraciones nifHDK. Las amplificaciones derivadas para ambas cepas muestran que efectivamente las secuencias que contienen los genes de la nitroganasa son utilizados en la recombinación ya que al caracterizarlos mediante la hibridización con el detector p15b (Fig. 9; carriles 9 y 17) se observan cuatro bandas: nifHb::GDYN1 (11.3kb), una recombinante nifH5'b/3'a::GDYN1 (10.9 kb), nifHa (9.0 kb) y nifHc (4.0 kb). Por la baja resolución del gel entre las bandas nifHb::GDYN1 y nifH 5'b/3'a::GDYN1, en esta zona las bandas migran aparentemente como una sola. Al realizar el análisis densitométrico para las cepas amplificadas se observó el patrón característico de tres bandas con la proporción 2:1:2. Los resultados de la densitometría para la cepa TAL-182 nifHb::GDYN1 (Fig. 9; carril 9) presentaron la relación de bandas 6:1:6 indicando que es una amplificación de seis veces y

para la cepa NITRAGIN-8251 nifHb::GDYN1 la proporción encontrada fue 3:1:3 correspondiente a una triplicación (Fig. 9; carril 17). En las dos cepas analizadas la amplificación ocurrió entre la región nifHa y nifHb.

El caso más extremo donde la región para recombinar quedó reducida a 1 kb entre los operones nifHDK a y b se analizó en las cepas derivadas de la TAL-182 nifHa::GDYN1 y NITRAGIN-8251 nifHa::GDYN1 (Fig. 9; carriles 2 y 12) mediante el perfil de plásmidos, la hibridización con el detector nifH y los cósmidos del pSim de la cepa CFN-42. Encontrándose que en ambas cepas las amplificaciones fueron generadas por recombinación entre las reiteraciones nifHDK a y b. En la figura 9 los carriles 8 y 16 muestran el patrón característico de hibridización con el detector de nifH donde se observan cuatro bandas: nifHa::GDYN1 (14.7 kb), una recombinante nifH 5'b/3'a::GDYN1 (10.9 kb), nifHb (5.6 kb) y la última nifHc (4.0 kb). El análisis densitométrico indica que en una duplicación todas las bandas son de intensidad similar, salvo la región nifHc que es doble, así en la cepa derivada de la TAL-182 nifHa::GDYN1 (Fig. 9; carril 8) se encontró la proporción 1:2:1:3 correspondiendo a una triplicación y en la cepa derivada de la NITRAGIN-8251 nifHa::GDYN1 (Fig. 9; carril 16) la relación obtenida fue 1:4:1:5 mostrando claramente la presencia de una amplificación de cinco veces entre la región nifHa y nifHb.

El perfil de plásmidos para la cepa TAL-182, representativa de las amplificaciones (Fig. 10; carriles 13 y 14), corresponde a una amplificación (nifHa::GDYN1) de la región entre los nifHDK

de tres veces, la cual generó un pSim de aproximadamente 800 kb que hibridizó con el detector de nifH.

Las hibridizaciones con los cósmidos del pSim de la cepa de R.1. bv.phaseoli CFN-42 (Fig. 7) nos permitieron caracterizar a las amplificaciones derivadas de las cepas TAL-182 nifHa::GDYN1 (Fig. 11), TAL-182 nifHb::GDYN1 (Fig. 12) y TAL-182 nifHc::GDYN1 (Fig. 13); delimitando que las zona entre los cósmidos 7 y 45 fué donde se detectó DNA amplificado y la hibridización con los cósmidos restantes no reveló bandas amplificadas (datos no mostrados). Se encontró que el orden de los cósmidos establecido para la cepa CFN-42 (Fig. 8) coincidió con el observado para la TAL-182, lo cual se corroboró por la caracterización de las deleciones obtenidas (ver resultados más adelante).

En el caso de las cepas amplificadas derivadas de la NITRAGIN-8251 analizadas mediante la técnica de Eckhardt (Fig.15; carriles 11 y 12). Se observa al hibridizar con nifH, que el pSim incrementa su tamaño en aproximadamente 250 kb utilizando como sitios de recombinación para la amplificación los operones nifHDK. Las hibridizaciones con los cósmidos de la cepa CFN-42 se presentan en las figuras 15 y 16 respectivamente, para la cepas NITRAGIN-8251 nifHa::GDYN1 y NITRAGIN-8251 nifHb::GDYN1, indicando que unicamente la región entre los cósmidos 7 y 45 presento bandas amplificadas, no así, con los cósmidos restantes (datos no mostrados). Asimismo nos indicó que el ordenamiento de los cósmidos caracterizado para el pSim de la cepa CFN-42 (Fig. 8) fue mantenido en la cepa NITRAGIN-8251, lo cual se confirmo posteriormente por el mapeo de las deleciones ob-

tenidas en estas cepas (ver resultados más adelante).

DELECCIONES

Las deleciones en la cepa TAL-182 se seleccionaron en el medio con sacarosa al 17.5%, analizándose 8 cepas derivadas de la TAL-182 nifHa::GDYNI, 12 cepas derivadas de la TAL-182 nifHb::GDYNI y 25 cepas derivadas de la TAL-182 nifHc::GDYNI. En todos los casos se detectaron en mayor medida la producción de deleciones (Tipo I) entre los operones nifHDK a y b. En menor proporción se detectaron otros tipos de deleción (Tipo III y V) que utilizan para recombinar secuencias distintas a los de los genes nifH. Estas solamente se obtuvieron con las inserciones en nifHa y nifHc (Tabla III). La frecuencia a la cual ocurren estos rearrreglos fue nuevamente variable, aunque la frecuencia de aparición de los fenómenos de deleción mantiene la predicción de restricción de los sitios para recombinar, así con la inserción en nifHc es 2.3 veces mayor que la inserción en nifHb y esta a su vez es más grande por 16 veces que en nifHa (Tabla II).

En la cepa NITRAGIN-8251 los eventos de deleción se aislaron seleccionando con sacarosa en concentraciones que variaron del 2.5 al 10%, analizándose 18 cepas derivadas de la inserción en nifHa::GDYNI y 17 cepas derivadas de la inserción en nifHb::GDYNI. También en esta cepa las deleciones entre las reiteraciones nifHDK a y b (Tipo I) fueron las más frecuentes y solamente con la inserción en nifHa se encontró la curación del

pSim (Tabla III). La frecuencia a la cual se presentaron estos eventos fue 3.4 veces menor con la inserción en nifHa con respecto a la inserción en nifHb, lo cual es consistente con la reducción de la zona para recombinar entre los nifH siendo proporcional al área restringida (Tabla II).

La caracterización de las cepas deletadas de la TAL-182 y NITRAGIN-8251 se realizó mediante el análisis de los perfiles de plásmidos (Fig. 10 y 15) hibridizados con el detector de nifH (Fig. 9) y cósmidos del pSim de la cepa CFN-42 (Fig. 14 y 18). Para ambas cepas al realizar la hibridización con el detector de los genes de la nitrogenasa (Fig. 9; carriles 5 y 14) se observa la presencia de una sola banda con la migración característica de una banda híbrida nifH5'a/3'b generada por recombinación entre los operones nifHDK a y b, correspondiendo a la delección Tipo I. El tamaño de la delección fue de aproximadamente 180kb para la cepa TAL-182 y de 131 kb para la cepa NITRAGIN-8251 (Fig. 10 y 15).

Particularmente en la cepa TAL-182 con las inserciones en nifHa y nifHc (Tabla III) se generaron dos tipos más de delecciones (Tipo III y V), observándose mediante la técnica de Eckhardt y caracterizándolas al hibridizar con el detector de los nifH (Fig. 9). Una cepa posee solamente la banda característica de nifHb, correspondiendo a la delección Tipo III (Fig.9; carril 6) y el perfil de plásmidos nos muestra que es una delección de aproximadamente 128 kb (Fig. 10; carriles 9 y 10). La delección Tipo V no da señal de hibridización con el detector de nifH (Fig. 9; carril 7) y corresponde a una delección de

aproximadamente 323 kb (Fig. 10; carriles 11 y 12).

El análisis con los cósmidos del pSim de R.1. bv. phaseoli CFN-42 nos permitió mapear las deleciones (Mapa I) y concluir que el orden establecido para el pSim de la cepa CFN-42 (Fig. 8) corresponde al encontrado para el pSim de la cepa TAL-182. En las deleciones Tipo I y V los cósmidos que perdieron bandas fueron el cGD 7,101, 28, 15 y 45 (Fig. 8) y la deleción Tipo III sólo perdió bandas en los cósmidos 7,101 y 28; cabe señalar que el cósmido 101 fue el único que se deletó completo en las tres deleciones (Mapa I). En cambio, con los otros cósmidos se perdieron solamente algunas de sus bandas. Con respecto a los cósmidos del 47 al 103 (Fig. 7) no se detectaron pérdidas de bandas en ninguno de ellos (datos no mostrados).

La suma del tamaño de las bandas perdidas para la deleción Tipo I fue de 155 kb y 107 kb para la deleción Tipo III (Mapa I), presentando una pequeña diferencia de 25 kb y 21 kb de menos para las deleciones Tipo I y III respectivamente, en relación al tamaño de las deleciones caracterizadas por la técnica de Eckhardt (Fig. 10). Posiblemente esta diferencia se deba a la resolución del gel en esta zona.

En la deleción Tipo V la suma del tamaño de las de bandas perdidas fue de 188 kb (Mapa I), estableciéndose una diferencia no explicada con respecto al tamaño calculado del perfil de plásmidos (Fig. 10). Esta diferencia de aproximadamente 135 kb, sólo es explicable con el argumento de DNA no detectado, ya que el pSim de la cepa TAL-182 (573 kb) es mayor que el pSim de la cepa CFN-42 (390 kb) y por lo tanto no podemos detectar las 180

kb de DNA extra que posee. La ubicación del DNA no detectado en el pSim es variable, sin embargo de acuerdo al Mapa I podríamos sugerir que una buena parte (135 kb) se localizara en el cósmido 45 entre las bandas 45.7 (nifHb) y 45.4. Hasta este momento no sabemos de donde provienen estas secuencias para poder caracterizar región.

En el Mapa II, que esquematiza los resultados obtenidos para la cepa NITRAGIN-8251 se observa claramente que el orden de los cósmidos se mantiene igual al que se presentó en la cepa CFN-42 (cCG7, 101, 28, 15 y 45 ; Fig. 8). La suma de las bandas deletadas fue de 121 kb, presentando una pequeña diferencia de 10 kb con respecto a la delección caracterizada por el análisis de plásmidos (Fig. 15 carriles 7 y 8). La cepa derivada de la NITRAGIN-8251 nifHa::GDYNI la cual presentó curación de su pSim (Fig. 15 ; carriles 9 y 10) no dió señal de hibridación con el detector nifH y con los cósmidos del pSim de la cepa CFN-42 (Fig. 7).

CEPA DEL TIPO II: CIAT-894

AMPLIFICACIONES

Para la cepa CIAT-894 sólo se aisló una amplificación procedente de la inserción del cassette GDYNI en la región nifHa (Fig. 19; carril 2) obteniéndose en el medio selectivo con gentamicina a 40ug/ml. Sin embargo al determinar la condición para obtener duplicaciones, nos encontramos con que la cepa se

amplificó, durante el período de los subcultivos. De manera que la frecuencia obtenida fue de 1.12 como se observa en la Tabla II haciendo difícil por tanto la estimación real del evento de amplificación. La cepa se analizó con el detector nifH y localizamos la presencia característica de las cuatro bandas resultantes de un evento de amplificación entre nifHa y b: nifHa::GDYNI (19 kb), nifH5'b/3'a::GDYNI (16 kb), nifHb (5.6 kb) y nifHc (4 kb) (Fig. 19; carril 6). Al realizar el análisis por densitometría se encontró la proporción de bandas 1:2:1:3 indicando claramente que la cepa posee una triplicación generada por recombinación entre los operones nifHDK a y b.

El perfil de plásmidos (Fig. 20; carriles 21 y 22) muestra que el pSim de la cepa CIAT-894 ha aumentado de tamaño aproximadamente 200 kb debido a la triplicación de la región entre los nifH a y b. Al realizar la hibridización los cósmidos del pSim de la CFN-42 (Fig. 21) se observó el incremento en intensidad de algunas bandas indicando que la región entre los cósmidos 7 y 45 (Fig.8) fue amplificada no así en los cósmidos restantes del pSim (datos no mostrados), lo cual es confirmado por el análisis de las deleciones obtenidas para esta cepa (ver los resultados más adelante).

DELECCIONES

Las deleciones en la cepa CIAT-894 se aislaron con sacarosa al 10%, analizándose 24 cepas derivadas de la inserción en nifHa

(Fig. 19; carril 2) ocurriendo los eventos de delección a una frecuencia de 10^{-5} (Tabla II). Al caracterizar las delecciones obtenidas con el detector de nifH (Fig. 19; carriles 3, 4 y 5) se observó que ninguna de ellas agrupadas en tres tipos distintos, (Tipo III, IV y V) se produjeran por recombinación entre las secuencias de los operones nifHDKa y b, como se demostró para el caso de las amplificaciones en esta cepa, por lo tanto los fenómenos de delección ocurren preferentemente usando otro tipo de elementos reiterados en el plásmido.

La caracterización de las cepas por la presencia de los nifH, nos permitió separar a las delecciones en los Tipos III, IV y V (Fig. 19; carriles 3, 4 y 5). El análisis mediante el perfil de plásmidos (Fig. 20) nos permitió distinguir cinco patrones diferentes de delección en el pSim de la cepa CIAT-894 y cabe señalar, que el tamaño de los pSim deletados fue diferente en cada caso, aunque pertenezcan al mismo tipo de delección.

La caracterización de las delecciones del pSim de la cepa CIAT-894 mediante las hibridizaciones con los cósmidos de la cepa CFN-42 (Fig. 7); nuevamente indican que la región deletada quedó comprendida entre los cósmidos 7 y 45 (Fig. 8 y 21), puesto que la hibridización con los cósmidos del 47 al 103 están conservados en todas las cepas deletadas (datos no mostrados).

Al realizar el análisis con los cósmidos del pSim de la CFN-42 correspondientes a la delección en el pSim de la cepa CIAT-894 se construyó el Mapa III, donde se observan siete patrones de delección estableciéndose para cada tipo de delección el uso de distintas secuencias reiteradas para recombinar, razón por lo

cual subdividimos a los tipos de delección (III, IV y V) en los subtipos 1, 2 y 3.

Los tamaños de los pSim con las distintas delecciones fueron caracterizados por la técnica de Eckhardt, donde se observa que la delección menor fue de 99 kb aproximadamente y de 271 kb para la delección mayor (Fig. 20), lo cual contrasta con el análisis de la suma de bandas deletadas, ya que la delección más pequeña perdió 22 kb aproximadamente y 136 kb la delección mayor (Mapa III). Por lo cual, incluimos la presencia de DNA no detectado, en el cósmido 7 entre las bandas 7.3 (nifHa) y 7.4 para equilibrar el peso de las delecciones detectadas por el análisis del perfil de plásmidos. Dado que los cósmidos de la cepa CFN-42 cubren al menos 390 kb y puesto que el pSim de la CIAT-894 es aproximadamente 120 kb mayor, hasta este momento no conocemos que tipo de secuencias estén contenidas en el DNA no detectado, para poder caracterizarlo.

CEPA DEL TIPO III: BRASIL-5.

DELECCIONES

Las delecciones en la cepa BRASIL-5 se obtuvieron a partir de la recombinante sencilla con la inserción en nifHa (Fig. 19; carril 8) en el medio selectivo con sacarosa al 10%. En la tabla II se observa que la frecuencia a la cual se presentaron las delecciones fue la mayor de todas las inserciones en nifHa en las distintas cepas y correspondió a 10^{-4} .

El análisis de las cepas mediante el perfil de plásmidos indica que el pSim deletó al menos 180 kb (Fig. 23, carril 7) y al caracterizar los nifH de estas cepas se observó que todas las deleciones mantenían las reiteraciones nifHb y nifHc (Fig. 19 carril 9) correspondiendo al Tipo IV de deleción (Tabla III) que también es presentado por la cepa CIAT-894. Nuevamente en la cepa BRASIL-5 se presenta el uso de otras secuencias reiteradas para la recombinación en lugar de los operones nifHDK.

Al realizar las hibridaciones con los cósmidos del pSim de la cepa CFN-42 (Fig. 7) fue sorprendente el hecho de que las cepas deletadas de la BRASIL-5 conservaran en su totalidad las bandas de los cósmidos de las regiones entre nifHa y nifHb, obviamente a excepción de la banda 7.1 (nifHa) localizada en el cósmido 7 de su pSim (Fig. 23) y además en los cósmidos restantes no se perdió ninguna banda (datos no mostrados). Debido a que el pSim de la cepa BRASIL-5 es de aproximadamente 510 kb, nuevamente requerimos el argumento de DNA no detectado para explicar a las deleciones de 180 kb puesto que los cósmidos usados como detectores cubren al menos 390 kb y se encuentran presentes en las cepas deletadas por lo tanto la posición del DNA no detectado se localizó entre el cósmido 7 y 47. Actualmente no sabemos que tipo de material genético contiene esta región sugerida.

CEPA TIPO IV: F-14**DELECCIONES**

Las delecciones en a cepa F-14 se obtuvieron a partir de la inserción del cassette GDYNI an la región nifHa mediante un evento de recombinación sencilla (Fig. 19, carril 11) aislado en el medio selectivo con espectinomycin 100ug/ml. Estas cepas se caracterizaron por hibridización con los detectores p15b, pGUS3 y pSUP202 (Fig. 6) dando señal positiva los tres probadores en la región de nifHa y en su pSim. Dada la alta frecuencia de curación del pSim de la F-14 y por ende la baja tasa de obtención de transconjugantes con el cassette GDYNI inserto en cualquiera de las regiones nifH. Se decidió checar otra vez las cepas antes mencionadas, las cuales se mantuvieron aproximadamente durante un año en el medio de selección, siendo resembradas cada 45 días. Primeramente mediante la técnica de Eckhardt se encontró sorprendentemente una cepa con una delección en su pSim no seleccionado con sacarosa (Tabla II) que produjo dos plásmidos de aproximadamente 220 kb y 390 kb (Fig. 23, carril 11 y 12). Nuevamente se hibridizó con los detectores p15b, pGUS3 y pSUP202 (Fig. 6) dando señal positiva en ambos plásmidos. Ante la posibilidad de tener cepas mezcladas se obtuvieron colonias aisladas a partir de la cepa parental que poseían solamente el plásmido de 390 kb (Fig. 23, carril 14) y posteriormente se aislaron cepas derivadas con el plásmido de 220 kb (datos no mostrados).

Una vez purificada la cepa F-14 con su pSim deletado se caracterizó con el detector de nifH (Fig. 19; carril 12) encontrándose que esta cepa presenta la delección Tipo II con la presencia de la banda recombinante nifHa::GDYNI y nifHb (Tabla III) además de tener señales de hibridización positiva con los probadores pGUS3 y pSUP202 en esta misma zona (datos no mostrados).

El análisis realizado mediante la hibridización con los cósmidos de la cepa CFN-42 para determinar la delección de la cepa F-14 (Fig. 25), nos indica que perdieron la región de las bandas ubicadas entre los cósmidos cCG 7, 101, 28, 15 y 45 (Fig. 8) que están localizadas entre los genes nifHa y nifHb. Las hibridizaciones realizadas con los cósmidos del 47 al 103 (datos no mostrados) señalan que no se perdió DNA en esta zona.

Para la cepa F-14 se estableció el Mapa IV, encontrando que conserva íntegramente la ubicación de los cósmidos reportado para la CFN42 (Fig. 8). La suma de las bandas perdidas en la cepa deletada corresponden a 160 kb aproximadamente, estableciéndose una diferencia de 40 kb con respecto a la caracterizada mediante el Eckhardt, posiblemente esta diferencia se deba a la resolución propia del gel en esta zona.

DISCUSION

a) PLASTICIDAD DEL GENOMA DE R.1.bv. phaseoli

La estructura del genoma de Rhizobium resulta interesante por la abundancia de secuencias reiteradas, que intervienen en la generación de rearrreglos. Las cuales incluyen a las secuencias de inserción (ISR1, ISRm1, ISRm2 y RS), secuencias con función desconocida (RSB, RSY, RSG y RS), los genes completos en los cuales las reiteraciones son funcionales (nodD, rpoN, la caja nod, fixN, nifDK y nifH), algunas regiones regulatorias largas y aún el extremo amino de algunos genes (secuencias repetidas relacionadas a nif y RtRs) que participan en la plasticidad genómica característica de esta especie (Romero, 1991).

Flores, et al (1988) han caracterizado en Rhizobium phaseoli rearrreglos genómicos donde participan tanto las secuencias de las reiteraciones cromosomales como las plasmídicas, y a su vez, se han detectado entre los plásmidos de la misma cepa, curaciones y cointegraciones (Brom, et al., 1991; Martínez-Salazar, 1991); amplificaciones y deleciones (Romero, et al., 1991); y translocación (Martínez-Salazar, 1991).

Particularmente, en el pSim de la CFN-42 se encontró que posee al menos 11 familias de secuencias reiteradas con dos o tres elementos cada una (Girard, et al., 1991); dentro de las cuales están incluidas los genes nifH (familia A), que fueron los

responsables de generar por recombinación los eventos de amplificación y delección; además de la intervención de otros elementos reiterados pertenecientes a las familias C y E que participan menos frecuentemente en tales rearrreglos (Romero, 1991).

Del análisis realizado con las cepas de R.1. bv. phaseoli (Tabla III; Fig 9 y 19) se establece que los nifH a y b se encuentran en orientación directa y por ende son susceptibles de generar tanto amplificación como delección por recombinación. Los rearrreglos que afectan la estructura de los pSim de las cepas de R.1. bv. phaseoli de este estudio ocurren a una alta frecuencia (10^{-3} a 10^{-5}) de manera similar a lo reportado en el pSim de la cepa CFN-42 (Romero, 1991). De esta manera al evaluar los rearrreglos en las cepas TAL-182, NITRAGIN-8251 y CIAT-894, se demostró que las reiteraciones nifH son también las secuencias utilizadas para generar amplificaciones. Las delecciones se generaron a través de los operones nifHDK en las cepas NITRAGIN-8251 y F-14; en la cepa TAL-182 otras secuencias reiteradas también participaron además de utilizar preferente de las reiteraciones nifH. En las cepas CIAT-894 y BRASIL-5 las delecciones ocurrieron solamente con reiteraciones distintas a los nifH.

En los rearrreglos generados por recombinación entre las secuencias reiteradas de los genes de la nitrogenasa en las cepas TAL-182 (Mapa I), NITRAGIN-8251, (Mapa II), y F-14 (Mapa V) se observa que las delecciones cubren un sector que va de 130 a 180 kb aproximadamente, perdiendo la información presente en los

cósmidos 7, 101, 28, 15 y 45; incluyendo a los de la cepa CIAT-894 (Mapa III) la cual generó sus deleciones con otras reiteraciones. Esto indica que la región ubicada entre los operones nifHDK a y b de las cepas analizadas es consistente con el arreglo encontrado en la cepa CFN-42 para el sector de 120 kb (Fig. 8), lo cual sugiere que esta zona sea una región altamente conservada entre las cepas de R.1. bv. phaseoli.

Al respecto, Rodríguez (1992) ha determinado mediante la construcción de un árbol simbiótico por el método de máxima parsimonia que la información contenida en los cósmidos 7, 101, 28 y 15 (Fig. 7); son secuencias altamente conservadas en R.1. bv. phaseoli y por tanto al excluirse del análisis filogenético no generan distorsiones, lo cual corrobora fuertemente los mapas establecidos para las cepas de este estudio.

Con las deleciones caracterizadas, para la cepa BRASIL-5 (Fig. 19 y 23) no fue posible establecer el ordenamiento de los cósmidos, ya que la región deletada no tiene homología con los detectores usados (Fig. 7) indicando la presencia de DNA no caracterizado en el pSim. La presencia del DNA deletado aunada a la homología de sólo un 72% de los cósmidos del pSim de la cepa CFN-42, apoyan la diferencia encontrada mediante el análisis simbiótico y cromosomal (Rodríguez, 1992) para establecer la separación de la cepa BRASIL-5 en un grupo distinto al de la cepa CFN-42 y estos a su vez separados del grupo de las cepas TAL-182 y NITRAGIN-8251.

Martínez-Salazar, et al (1991), Michiels, et al (1991) y Selbitschka, et al (1991) han demostrado la existencia del sis-

tema RecA para recombinación homóloga en R.1 bv. phaseoli; bv. viciae y R. meliloti, lo cual apoya consistentemente a el mecanismo de recombinación que opera para generar los rearrreglos genómicos característicos de Rhizobium sea por vía de recA.

La participación de recA en los rearrreglos generados por recombinación entre nifH fue demostrada por Martínez-Salazar (1991) al construir derivadas recA⁻ en las cepas CFN-42 y F-14, las cuales disminuyeron su frecuencia de recombinación 100 y 300 veces respectivamente. Así, independientemente del origen de las cepas analizadas y el tipo de reiteración de los nifH, los eventos de amplificación y delección son dependientes del mecanismo de recombinación mediado por recA.

La importancia biológica de los genes de la nitrogenasa es sumamente conocida y por otra parte, hemos demostrado que los genes nifH tienen un papel dinámico en la generación de rearrreglos dentro del pSim de R.1 bv. phaseoli. Aunado a estas características ha recibido gran interés el hecho de que las reiteraciones nifH tengan un efecto de dosis génica para la fijación de nitrógeno. Sin embargo, la presencia de los nifH reiterados no son una condición indispensable para establecer la relación simbiótica.

Esta claramente comprobado que el frijol (Phaseolus vulgaris) es nodulado por dos especies del mismo género R. phaseoli y R. tropici (sin reiteraciones nifH). De manera similar la soya es nodulada por dos especies de géneros distintos R. fredii (con reiteración de nifH) y B. japonicum. Un caso que resulta interesante reportado por Eardly, et al

(1992) al realizar aislados de cepas en campos de alfalfa es el de Rhizobium Or 191. Esta cepa tiene tres características sobresalientes: a) capacidad de nodular frijol y alfalfa; b), el análisis del rRNA 16S la ubica como una cepa perteneciente a R.1. bv. phaseoli y c) posee una región nifH, la cual es sustancialmente diferente de todas las secuencias de genes de nitrogenasa de las cepas de Rhizobium y de otras no rhizobiaceas.

Las observaciones realizadas por Eardly, et al (1992) al comparar las filogenias de los genes de nifH y los rRNA 16S, son consistentes con los resultados de un análisis más extenso realizado por Rodríguez (1992). Al comparar el árbol filogenético consenso obtenido con secuencias cromosomales versus el árbol filogenético consenso obtenido con secuencias del plásmido simbiótico para cepas de R.1. bv phaseoli. De estas investigaciones se concluye que las filogenias basadas en los genes de los plásmidos simbióticos no corresponden a las filogenias basadas en los genes cromosomales, debido a que tienen historias evolutivas diferentes.

Con lo anteriormente descrito, resulta de interés conocer el origen del gen de la nitrogenasa en las cepas de Rhizobium. Ya que se ha visto que su participación en la fijación de nitrógeno se ve favorecida al estar reiterado, además de proporcionar usualmente un sitio de recombinación en el pSim para la generación de rearrreglos. Con la evidencia sustentada para ambas funciones me pregunto lo siguiente: ¿El gene de la nitrogenasa se localizó primeramente en plásmido o en cromosoma? ¿El gen de nifH se localizó simultáneamente en plásmido y

cromosoma? ¿ Es la reiteración de los nifH la estrategia a seguir en Rhizobium o sólo es un caso particular ?

La posición de los genes nifH reiterados, se localiza tanto en cromosoma (Azorhizobium) como en plásmido (Rhizobium), lo cual sugiere que no hay un sitio preferencial para ubicar a las reiteraciones nifH. Considerando lo anterior, valdría cuestionar si: ¿Las reiteraciones son el resultado de la duplicación del gene existente en el cromosoma y/o plásmido? ¿La reiteración es el resultado de la transferencia del gene proveniente del cromosoma y/o plásmido? .

La idea de la duplicación de los genes de la nitrogenasa es una alternativa plausible para generar reiteración o la variación de una proteína alternativa con una eficiencia mayor en la fijación de nitrógeno. Esta propuesta esta apoyada por los reportes de Davis y Johnston (1990) con respecto a las reiteraciones de los genes nodD, que proporcionan un ejemplo de duplicación seguido de divergencia. Debido a que las reiteraciones presentan diferencias en sus patrones de regulación y en la capacidad de activar a otros genes.

b) CONSECUENCIAS FENOTIPICAS DE LOS REARREGLOS

Los rearreglos producidos por recombinación entre las regiones nifH y entre otras secuencias pueden conducir a la pérdida o mejoría de características deseables . Es conocido que las amplificaciones en tandem son el resultado de una rápida adaptación a condiciones ambientales que demandan la alta

expresión de un producto génico.

La amplificación de secuencias de DNA de R.1. bv. phaseoli en un vehículo independiente en multicopia ha permitido la identificación de la secuencia psi involucrada en la inhibición de la síntesis de polisacáridos (Borthakur, et al., 1985), en R. leguminosarum la capacidad de nodulación es inhibida al portar en multicopia los genes nodABC (Knight, et al., 1986). En el pSim de la cepa de R.1. bv phaseoli CFN-42 se ha demostrado la amplificación de la región nifHa de 9 Kb (Durán, 1991) y de la región de 120 Kb comprendida entre los nifHa y nifHb (Romero, et al., 1991), para ambos casos la amplificación es inestable ya que desaparece al no existir ninguna presión selectiva. Esta última característica es particularmente atractiva, al permitir la generación de adaptaciones útiles sin comprometer irreversiblemente la estructura del genoma.

Una de las características de algunas de las cepas de R.1.bv. phaseoli es la producción de melanina. En un estudio genético, Borthakur, et al (1987) demostraron la existencia de dos loci mel I y mel II necesarios para la biosíntesis de melanina, los cuales al ser mutados abolen su función, pero en mel II (que corresponde a nifA) además se elimina la capacidad de fijar nitrógeno. En el pSim de la cepa de R.1. bv. phaseoli CFN-42 (Girard, et al., 1991) ubica un probable nifA en la banda 21 del cósmido 15 y mel I esta localizado en el cósmido 51 en la banda 55-56 (Fig. 7). Así, la ubicación de los genes de la síntesis de melanina en pSim nos permiten observar los cambios fenotípicos producidos por los rearrreglos.

Para el caso de las amplificaciones obtenidas por recombinación entre los nifHDK a y b en las cepas TAL-182 y NITRAGIN-8251 se detectó claramente un incremento en la producción de melanina, producida por una mayor expresión de los mel I y II. Estos resultados apoyan claramente el evento de amplificación, pero falta por investigar el efecto en funciones con mayor relevancia biológica como son la nodulación y la fijación de nitrógeno.

Hasta ahora, la evidencia con las cepas derivadas amplificadas por recombinación entre nifH en la cepa CFN-42 (Romero, 1991) indican que poseen una cinética de nodulación indistinguible de las cepas progenitoras. En contraste, en la misma cepa al amplificarse con otras secuencias reiteradas (elementos C y E) se encuentran severamente inhibida en su capacidad de nodulación; debido a la sobreproducción de nodABC (Romero, 1991).

Sin duda alguna, las deleciones son los eventos que aportan mayor información con respecto a la estructura y funciones del pSim de las cepas analizadas.

La cepa TAL-182 reviste un interés particular debido a que es una cepa más competitiva cuando se realizan inóculos múltiples, independientemente del tipo de suelo y contenido de nitrógeno (Somasegaran y Bohlool, 1990). Debido al interés agronómico que reviste esta cepa los estudios referentes a su funcionalidad son necesarios, razón por la cual fue elegida la cepa TAL-182 en este estudio.

Particularmente, en la cepa TAL-182 se detectaron tres

tipos de delección (Fig. 9 y 10). En las delecciones Tipo I y Tipo III al checar la producción de melanina, fue evidente que tuvieron una baja sensible en la producción de este pigmento, en contraste para la delección Tipo II (Tabla III, Fig 9) la producción de melanina fue igual a la cepa silvestre. De acuerdo al mapa del pSim de la cepa CFN-42 (Girard, et al., 1991), se perdería el locus de mel II (nifA) en las delecciones Tipo I y III; y por lo tanto mel I estaría activo, produciendo pequeñas cantidades de melanina. Para la delección Tipo II es evidente que mel II esta presente, lo cual es corroborado por el Mapa I en donde podemos observar que el cósmido 15 no se pierde y por lo tanto es en esta región donde esta ubicado mel II, de manera que la producción de melanina se encuentra a su nivel normal.

George, et al (1992) reportó en la cepa Tal-182 la presencia de dos delecciones obtenidas mediante la inserción del Tn-5, las cuales corresponden a las delecciones Tipo I y II de este trabajo. El análisis de estas delecciones para las funciones de nodulación y fijación de nitrógeno fueron realizadas por George y Robert (1991) indicando que las delecciones caracterizadas han perdido los genes para estas funciones, lo cual es corroborado por el mapeo realizado para esta cepa (Mapa I). Además de ser consistente con el análisis de complementación con los genes nodDABCIJ de R.1. bv viceae realizado por George, et al (1992) los cuales reestablecieron la capacidad de nodular en las delecciones Tipo I y II; unicamente para la delección Tipo II se mantuvo la capacidad de fijar nitrógeno, lo cual es consistente con la presencia del gene de nifA presente en esta cepa.

La cepa NITRAGIN-8251 (Tabla III) fue la única que presentó el fenómeno de curación del pSim además de tener la delección Tipo I (Fig. 9 y 15). Soberón-Chavez (1983) reportó para la misma cepa en condiciones de curación (incubación durante un período de 5 a 7 días a 37 C) lo que la frecuencia de curación fue del 10%. Sin embargo, esta pérdida es de un plásmido distinto al pSim; pues los análisis de hibridización indican que la cepa curada presenta las tres reiteraciones de los genes nifH, lo cual confirma que el pSim esta presente. Además, la evidencia de que esta cepa sea incapaz de nodular, se puede explicar por que el plásmido curado estaría involucrado en la producción de LPS. Lo cual sería posible, ya que Brom, et al (1992) han demostrado que en la cepa de R. l. bv. phaseoli CFN-42 el plásmido b esta involucrado en la síntesis de LPS y que es indispensable para la nodulación.

La producción de melanina es otra evidencia que apoya al evento de la delección Tipo I de la cepa NITRAGIN-8251 (Fig. 15), debido a que las cepas deletadas disminuyen marcadamente la síntesis de melanina con respecto a la cepa silvestre, indicando que han perdido el locus de mel II (nifA) ubicado entre las regiones de nifHa y nifHb (Mapa II y Fig. 18). Esto es consistente con el hecho de que la curación reportada por Soberón-Chávez (1983) produzca melanina al igual que la cepa silvestre de la NITRAGIN-8251. De tal manera que la delección Tipo I caracterizada por la recombinación entre nifHa y nifHb es consistente con otras funciones del pSim. Faltaría por analizar si la cepa deletada puede nodular al tener el plásmido que se curó en

los experimentos antes mencionados.

Para la cepa CIAT-894, el mapeo realizado (Mapa III) apoya fuertemente el hecho de que se hayan perdido algunas funciones importantes, pues las hibridizaciones con los cósmidos de la cepa CFN-42 participantes en la deleción (cGC 7, 101, 28, 15 y 45 ; Fig. 8) llevan los genes nodABCD, nod box, nifA y nifHDK involucrados en las funciones de nodulación y fijación de nitrógeno. Debido a que en esta cepa se obtuvieron el mayor número de deleciones, un punto interesante sería establecer particularmente que funciones se pierden en cada tipo de deleción para determinar la posición de algunos genes y ubicar su correspondencia con lo establecido para la cepa de R.1. bv phaseoli CFN-42 (Fig. 8).

En la cepa BRASIL-5 se presentó un caso interesante, pues al tener una deleción de 180 kb (Fig. 19 y 23) y perder únicamente la reiteración del gene nifHa, conservando todos los cósmidos usados como detectores (Fig.7) plantea la posibilidad de establecer si el pSim deletado es igualmente funcional que el pSim completo, lo cual abre sin duda alguna un sin número de preguntas con respecto al DNA necesario del pSim para establecer simbiosis.

La deleción encontrada en la cepa F-14 corresponde al Tipo II (Fig. 19 y 23), que es similar a la caracterizada por Martínez-Salazar (1991) correspondiendo a una deleción de aproximadamente 120 kb, producida por recombinación entre los nifHa y nifHb (Mapa V), lo cual indica que hay pérdida de las funciones para nodulación y fijación de nitrógeno. En este caso

la producción de melanina no esta localizada en el pSim, pues cepas curadas del pSim producen el pigmento de melanina en los niveles similares a la cepa silvestre, lo cual indica que los genes nifA y/o mel I esten localizados en otros replicones. Además, cabe señalar que en esta cepa el fenómeno de curación ocurre con alta frecuencia.

Los resultados obtenidos hasta este momento, nos permiten plantear distintas líneas de investigación referentes a: la identificación y caracterización de las secuencias que estan participando en los rearrreglos; funcionalidad de los eventos de amplificación; caracterización de las deleciones en cuanto a los fenotipos que confieren; competencia; etc.

CONCLUSIONES

1. La integración del cassette GDYNI por dobles recombinantes en cada reiteración nifH del pSim de las cepas de R.1. bv phaseoli es variable, dependiendo de la cepa y del tipo de reiteración nifH que presenten.
2. Debido a que el cassette GDYNI contiene clonado a nifHa, éste se integra con mayor frecuencia en la región nifHa del pSim de las cepas estudiadas.
3. Se estableció que las regiones de los operones nifHDK a y b en los pSim de las cepas analizadas, se encuentran en orientación directa y por lo tanto son susceptibles de participar en los eventos de amplificación y delección.
4. Independientemente de la región nifH del pSim de las cepas de R.1. bv. phaseoli en donde se encuentre integrado el cassette GDYNI, los eventos de recombinación ocurren frecuentemente entre los operones nifHDK a y b.
5. La alta frecuencia de recombinación entre 10^{-3} y 10^{-5} sugiere que el mecanismo de RecA está operando en los rearrreglos del pSim de las cepas estudiadas.

6. El arreglo de los cósmidos establecido para la cepa de R.1.bv. phaseoli CFN-42 entre las reiteraciones nifHDK esta altamente conservado entre las cepas analizadas.
7. La región deletada entre los operones nifHDK de las cepas estudiadas comprende un región de 130 a 180 kb , la cual es consistente con el arreglo de las 120 kb deletadas en la cepa de R.1.bv.phaseoli CFN42.
8. Todos los eventos de amplificación del pSim caracterizados en este estudio ocurrieron entre las reiteraciones de los operones nifHDK.
9. Los eventos de deleción del pSim se produjeron tambien entre las reiteraciones nifHDK, pero el uso de otras secuencias reiteradas fue más frecuente entre las cepas estudiadas.
10. En los pSim de las cepas analizadas TAL-182, CIAT-894 y BRASIL-5 se ubicó la presencia de DNA (136kb a 180kb) que no esta contenido en los cósmidos del pSim de la cepa CFN-42.

BIBLIOGRAFIA

- Appleby, C.A. 1984. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. Ann. Rev. Plant. Physiol., 35:443-478.
- Borthakur, D., Downie, J.A., Johnston, A.W.B. y J.W. Lamb. 1985. psi, A plasmid-linked Rhizobium phaseoli gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet., 200:278-282.
- Borthakur, D., Lamb, J.W. y A.W.B. Johnston. 1987. Identification of two classes of Rhizobium phaseoli genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. Mol. Gen. Genet., 207:155-160.
- Bottomley, P.J. 1992. Ecology of Bradyrhizobium and Rhizobium. In: Biological Nitrogen Fixation. (Ed) Stacey, G., Burris, R.H. y H.J. Evans. Chapman and Hall, Inc. New York. p:293-348.
- Brewin, N.J., Wood, E.A., Johnston, A.W.B., Dibb, N.J. y G. Hombracher. 1982. Recombinant nodulation plasmids in Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol., 128:1817-1827.
- Brom, S., García de los Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D. y R. Palacios. 1992. Different plasmids of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. J. Bacteriol., 174:5183-5189.
- Brom, S., García de los Santos, A., Girard M.L., Dávila, G., Palacios, R. y D. Romero. 1991. High-frequency rearrangements in Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli plasmids. J. Bacteriol. 173:1344-1346.
- Broughton, W.J., Samrey, U. y J. Stanley. 1987. Ecological genetics of Rhizobium meliloti: symbiotic plasmid transfer in the Medicago sativa rhizosphere. FEMS Microbiol. Lett., 40:2551-2553.

- Bryant, J.A. 1991. Nitrogen-Fixation in plants: can Rhizobium live with non-legume crops? Trends in Biotechnol., 9:79-80.
- Burris, R.H. 1991. Nitrogenases. J. Biol. Chem., 266:9339-9342.

- Charles, T.C. y T.M. Finan. 1991. Analysis of a 1600-kilobase Rhizobium meliloti megaplasmid using defined deletions generated in vivo. GENETICS., 127:5-20.

- Christensen, A.M. y K.R. Schubert. 1983. Identification of a Rhizobium trifolii plasmid coding for nitrogen fixation and nodulation genes and its interaction with pJB5JI, a Rhizobium leguminosarum plasmid. J. Bacteriol., 156:592-599.

- Dávila, G., Brom, S., Flores, M., Girard, M.L., González, V., Louzada, M., Martínez, J., Martínez, E., Palacios, R., Piñero, D., Romero, D., and Valdez, A.M. 1988. The Symbiotic Genome of Rhizobium phaseoli. In: Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. R. Palacios and D.P.S., Verma Eds., APS. Press. St. Paul, Minnesota, USA. p. 187-191.

- Davis, E.O. y A.E.B. Johnston. 1990. Regulatory functions of the three nodD genes of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. Mol. Microbiol., 4:933-941.

- Dilworth, M. y A. Glenn. 1984. How does a legume nodule work? Trends Biochem. Sci., 9:519-523.

- Dixon, R.A. y C.J. Lamb. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 41:339-367.

- Djordjevic, M.A., Zurkowski, W. y B.G. Rolfe. 1982. Plasmids and stability of symbiotic properties of Rhizobium trifolii. J. Bacteriol., 151:560-568.

- Dowling, D.N. y W.J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. Ann. Rev. Microbiol., 40:131-157.

- Durán Stransky, L.M. 1991. Amplificación de una región del plásmido simbiótico de Rhizobium phaseoli CFN42 por medio de plásmidos integracionales. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 74 pp.

- Eardly, B.D., Materon, L.A., Smith, N.M., Johnson, D.A., Rumbaugh, D. y R.K. Selander. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium Rhizobium meliloti. Appl. Environ. Microbiol., 56:187-194.

- Eardly, D.B., Young, J.P.W. y R.K. Selander. 1992. Phylogenetic position of Rhizobium sp. Strain Or 191, a symbiont of both Medicago sativa and Phaseolus vulgaris, based on partial sequences of the 16S rRNA and nifH genes. Appl. Environ. Microbiol. 58:1809-1815.

- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1:584-588.

- Evans, H.J., Harker, A., Papen, H., Russell, S.A., Hanus, F.J. y M. Zuber. 1987. Physiology, Biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. Ann. Rev. Microbiol., 41:335-361.

- Flores, M., González, V., Brom, S., Martínez, E., Piñero, D., Romero, D., Dávila, G., and Palacios, R. 1987. Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium spp. J. Bacteriol., 169:5782-5788.

- Flores, M., González, V., Pardo, M.A., Leija, A., Martínez, E., Romero, D., Piñero, D., Dávila, G. y R. Palacios. 1988. Genomic instability in Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol., 170:1191-1196.

- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E. y J.A. Hoch. 1983. Cloning Structural gene sacB, wich encodes for exoenzyme levansucrase of Bacillus subtilis: Expression of the gene in Escherichia coli. J. Bacteriol., 153:1424-1431.

- George, M.L.C., Robert, F.M. y D. Borthakur .1992. Genetic analysis of Rhizobium leguminosarum bv phaseoli mutants defective in nodulation and nodulation suppression. Appl. Environ. Microbiol., 58:1050-1053.
- George, M.L.C. y F.M. Robert .1991. Autoregulatory response of Phaseolus vulgaris. L. to symbiotic mutants of Rhizobium leguminosarum bv phaseoli. Appl. Environ. Microbiol., 57:2687-2692.
- Girard, M.L. Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R. y G. Dávila. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. J. Bacteriol., 173:2411-2419.
- Halvorsen, L.J. y G. Stacey. 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. Microbiol. Rev., 50:193-225.
- Hasegawa, M., Hintermann, G., Simonet, J.M. Cramer, R., Piret, J., and Hutter R. 1985. Certain chromosomal regions in Streptomyces glaucescens tend to carry amplification and deletions. Mol. Gen. Genet., 200:375-384.
- Jordan, D.C. 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn. 1938, 321^{AL}, In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. (Ed) Krieg, N.R. y J.G. Holt. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Kaijalainen, S. y K. Lindstrom. 1989. Restriction fragment polymorphism analysis of Rhizobium galegae strains. J. Bacteriol., 171:5561-5566.
- Kaluza, K., Hahn, M. and H. Hennecke. 1985. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the nif region of the Rhizobium japonicum genome. J. Bacteriol., 162:535-542.
- Knight, C.D., Rossen, L., Robertson, G., Wells, B. y J.A. Downie. 1986. Nodulation inhibition by Rhizobium leguminosarum multicopy nodABC genes and analysis of early stages of plant infection. J. Bacteriol., 166:552-558.

- Kuhlbusch, T.A., Lobert, J.M., Crutzen, P.J. y P. Warneck. 1991. Molecular nitrogen emissions from denitrification during biomass burning. Nature, 325:135-137.
- Labandera, C.A. y M.M. Vincent. 1975. Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of Rhizobium trifolii. J. Appl. Bacteriol., 39:209-211.
- Lamb, J.W., Hombrecher, G. y A.W.B. Jhonstom. 1982. Plasmid-determined nodulation and nitrogen-fixation abilities in Rhizobium phaseoli. Mol. Gen. Genet., 186:449-452.
- Layzell, D.B. y Hunt, S., Moloney, A.H.M., Fernando, S.M. y L. Díaz del Castillo. 1990. Physiological, metabolic and developmental implications of O₂ regulation in legume nodules. En: Nitrogen Fixation: achievements and objectives. (Eds) Gresshuff, P., Ruth, L.F. Stacey, G. y W.E. Newton. Chapman and Hall, New York. p.21-32.
- Long, S. 1989 (a) Rhizobium-Legume Nodulation: Life together in the underground. Cell., 56:203-214.
- Long, S. 1989 (b) Rhizobium Genetics. Ann. Rev. Genet., 23:483-506.
- Maniatis, T.E., Fritsch, F. y J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Martínez, E., Pardo, M.A., Palacios, R. y M.A. Cevallos. 1985. Reiteration of Nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. Gen Microbiol., 131:1779-1786.
- Martínez, E., Romero, D., and Palacios, R. 1990. The Rhizobium Genome. CRC Plant Sciences., 9:59-93.

- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P. y M.A. Pardo. 1991. Rhizobium tropici, a Novel species nodulating Phaseolus vulgaris. L. Beans and Leucaena sp trees. Int. J. Syst. Bacteriol., 41(3):417-426.
- Martínez-Salazar, J.M. 1991. Clonación y caracterización del gene recA de Rhizobium phaseoli. Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM. 65pp.
- Martínez-Salazar, J.M., Romero, D., Girard, M.L. y G. Dávila. 1991. Molecular cloning and characterization of recA gene of Rhizobium phaseoli and construction of recA mutants. J. Bacteriol., 173:3035-3040.
- Mathis, J.M., Kuykendall, L.D. y G.M. Elkan. 1986. Restriction endonuclease and nif homology patterns of Bradyrhizobium japonicum USDA110 derivatives with and without nitrogen fixation competence: Appl. Environ. Microbiol., 51:477-480.
- Michiels, J., Vande, A. y J. Vanderleyden. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of the Rhizobium phaseoli recA gene. Mol. Gen. Genet., 228:486-490.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold. Spring Harbor, N.Y.
- Morett, E., Moreno, S. y G. Espín. 1988. Transcriptional analysis of the three nifH genes of Rhizobium phaseoli with gene fusions. Mol. Gen. Genet., 123:499-504.
- Newton, W.E. 1987. New, Man-Made N₂-Fixing systems. Phil. Trans. R.Soc. Lond. B., 317:259-277.
- Noel, K.D., Sánchez, F., Fernández, L., Leemans, J. y M.A. Cevallos. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol., 158 :148-155.
- Paau, A.S., 1989. Improvement of Rhizobium inoculants. Appl. Environ. Microbiol., 55:862-865.

- Peters, N.K. y D.P.S. Verma. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe. Interact.*, 3:4-8.
- Phillips, D.A. y L.R. Teuber. 1985. Genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation in legumes. In: Nitrogen fixation research progress. (Eds) Evans, H.J., Bottomley, P.J. y W.E. Newton. Martinus Nijhoff. Publ., E.E.U.U.
- Piñero, D., Martínez, E. y R.K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2825-2832.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón-Chávez, G., and Palacios, R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. *Nature.*, 299:724-726.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., Girard, M.L., Calva, E., and Palacios, R. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in Rhizobium phaseoli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82:1170-1174.
- Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Rhodes, C. y P. Berg 1976. Labeling deoxyribonucleic acid to a high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, 113:237-251.
- Rodríguez, O. (1992). Estructura y Evolución del genoma simbiótico de Rhizobium phaseoli. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM. 78 pp.
- Rolfe, B.G. y P.M. Gresshoff., 1988. Genetic Analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39:297-319.

- Romero Camarena, D.R. 1991. Mecanismos moleculares involucrados en la dinámica de familias reiteradas de DNA en el genoma de Rhizobium phaseoli. Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM. 90pp.
- Romero, D., Brom, S., Martínez-Salazar, J., Girard, Ma. de L., Palacios, R. y G. Dávila. 1991. Amplification and deletion of a nod-nif region in the symbiotic plasmid of Rhizobium phaseoli J. Bacteriol., 173: 2435-2441.
- Romero, D., Singleton, P.W., Segovia, L., Morett, E., Bohlool, B.B., Palacios, R. and G. Dávila. 1988. Effect of naturally occurring nif reiterations on symbiotic effectiveness in Rhizobium phaseoli. Appl. Environ. Microbiol., 54:848-850.
- Ronson, C.W., Bosworth, A., Genova, M., Gudrandsen, S., Hankinson, T., Kwiatkowski, R., Ratcliffe, H., Robie, C., Sweeney, P., Szeto, W., Williams, M. y P. Zablutowicz. 1990. Field release of genetically engineered Rhizobium meliloti and Bradyrhizobium japonicum strains. In: Nitrogen fixation. Achievements and objectives. (Eds) Gresshoff, P., Roth, L.E., Stacey, G. y W.E. Newton. Chapman and Hall, New York. London p: 397-403.
- Ruvkun, G.B., Long, S.R., Meade, H.M., Vanden Bos, R.C. y F.M. Ausubel. 1982. ISRm1: a Rhizobium meliloti insertion sequence that transposes preferentially into nitrogen fixation genes. J. Mol. Appl. Genet., 1:405-418.
- Sadowsky, M.J. y B.B. Bohlool 1985. Differential expression of the pea symbiotic plasmid pJB5JI in genetically dissimilar backgrounds. Symbiosis., 1:125-130.
- Sapienza, C.M., Rose, R., and Doolittle, W.F. 1982. High-frequency genomic rearrangements involving archaeobacterial repeat sequence elements. Nature., 299:182-185.
- Scott, K.F., Rolfe, B.G. y J. Shine. 1983. Nitrogenase structural genes are unlinked in the nonlegume symbiont Parasponia Rhizobium. DNA., 2:141 - 147.

- Segovia, L. 1988. Construcción de mutaciones en las regiones nif de Rhizobium phaseoli. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM. 27 pp.
- Selbitschka, W., Arnold, Wl, Priefer, U.B., Rottschäfer, T., Schmidt, M., Simon, R. y A. Pühler. 1991. Characterization of recA genes and recA mutants of Rhizobium meliloti y Rhizobium leguminosarum biovar viciae. Mol. Gen. Gent., 229:86-95.
- Simon, R., Priefer, U. y A. Pühler. 1983. Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of gram-negative bacteria. In: Molecular genetics of the bacteria. (Ed) A. Pühler. Springer Verlag. Berlin Heidelberg. p:98-106.
- Smith, B.E. 1990. Recent studies on the biochemistry and chemistry of nitrogenases. In: Nitrogen fixation: Achievements and Objectives. (Ed) Gress Huff, P., Roth, L.E., Stacey, G. y W.E. Newton. Chapman and Hall, New York. London. p:3-13.
- Soberón-Chávez, G., Nájera, R., Olivera, H. and L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a Rhizobium phaseoli symbiotic plasmid. J. Bacteriol., 167:487-491.
- Soberón-Chávez, G. y R. Nájera. 1989. Symbiotic plasmid rearrangement in a hyper-recombinant mutant of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. J. Gen. Microbiol., 135:47-54.
- Soberón-Chávez, G., Nájera, R., Calva, E. y M. Fernández. 1991.(a) Partial deletion of the Rhizobium phaseoli CFN23 symbiotic plasmids implies a concomitant amplification of plasmid DNA sequences. Mol. Microbiol., 5:89-95.
- Soberón-Chávez, G. Nájera, R., Espín, G. y S. Moreno. 1991.(b) Formation of Rhizobium phaseoli symbiotic plasmids by genetic recombination. Mol. Microbiol., 5:909-916.

- Soberón, G. 1983. Papel de los plásmidos indígenas de Rhizobium phaseoli en el proceso de nodulación. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM. 56pp.

- Somasegaran, P. y B.B. Bohlool. 1990. Single-strain versus multistrain inoculation. Effect of soil mineral N availability on Rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean, and dry bean. Appl. Environ. Microbiol., 56:3298-3303.

- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98:503-517.

- Sprent, J.I. 1987. The Ecology of the Nitrogen Cycle. Cambridge University Press, England. 151 pp.

- Steinmetz, M., LeCoq, D., Aymerich S., Gonzy-Tréboul, G. y P. Gay. 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted Bacillus subtilis enzyme levansucrase and its genetic control sites. Mol. Gen. Genet., 200:220-228

- Triplatt, E.W. 1990. The molecular genetics of nodulation competitiveness in Rhizobium and Bradyrhizobium. Mol. Plant-Microbe. Interact., 3:199-206.

- Valderrama, Blanco, M.B. 1989. Búsqueda y caracterización genética de sistemas alternativos para la nitrogenasa en Rhizobiaceas. Tesis de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM. pp.

- Valderrama, B., Dávalos, A. y J.Mora. 1992. Nucleotide sequence of reiterated nitrogenase genes regions and their differential expression and their differential expression in Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. VII PAABS Congress. XIX Congress of the Mexican Biochemical Society. PO-2F. Del 27 de Septiembre al 2 de Octubre de 1992.

- Vargas, C.L., Martínez, J., Megías, M. y C. Quinto. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad-range Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli strain CIAT899. Mol. Microbiol., 4 : 1899 - 1910.

- Vázquez, M., Dávalos, A., de las Peñas, A., Sánchez, F. y C. Quinto. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli strains. J. Bacteriol., 173:1250-1258.
- Weaver, R.W. y S.F. Wright. 1987. Variability in effectiveness of Rhizobia during culture and in nodule. Appl. Environ. Microbiol., 53:2972-2974.
- Woese, C. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev., 51:221-267.
- Young, J.P.W., Downer, H.L. y B.D.Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strains BTA11 by Polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA Gene segment. J. Bacteriol., 173:2271-2277.
- Zurkowsky, W. 1982. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of Rhizobium trifolii. J. Bacteriol., 150:99-1007.

TABLA I. CARACTERISTICAS DISTINTIVAS DE LAS CEPAS ANALIZADAS DE Rhizobium 74
leguminosarum bv. phaseoli.

C E P A S	TAL-182	NITRAGIN-8251	CIAT-894	BRASIL-5	P-14
Origen	Hawaii, USA	USA	Colombia	Brasil	México
Tipo de reiteración <u>nifH</u>	I	I	II	III	IV
22.0 kb	—				—
14.0 kb	—			—	—
9.0 kb	—	—	—		
5.6 kb	—	—	—	—	
4.8 kb	—		—	—	—
4.0 kb	—	—			
Distancia genética con respecto a la cepa CFN42	0.55	0.75	0.75	0.65	0.65
Plásmidos	4	4	5	4	4
Tamaño del pSym (b)	573	460	510	510	510
980 kb	—			—	
630 kb	—	—	—		—
510 kb	—	—	—	—	—
390 kb	—	—	—		
270 kb	—			—	
170 kb	—	—	—		
100 kb	—				—
Producción de Melanina	+	+	-	-	+

TABLA II Frecuencia de resrreglos en el pSim de las cepas analizadas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli.

CEPA	INSERCIÓN DEL GDYN1 EN LA REGION <u>nifH</u> :	F R E C U E N C I A D E: AMPLIFICACIONES	D E: DELECCIONES
TAL-182 (1)	a	1.29×10^{-5}	4.62×10^{-6}
	b	1.17×10^{-3}	7.14×10^{-5}
	c	5.90×10^{-4}	1.67×10^{-4}
NITRAGIN-8251 (1)	a	1.60×10^{-4}	7.30×10^{-5}
	b	7.60×10^{-3}	2.45×10^{-4}
CIAT-894 (1)	a	1.12	1.59×10^{-5}
BRASIL-5 (2)	a	----	1.59×10^{-4}
F-14 (2)	a	----	1.0×10^{-6} *

1. Inserción del GDYN1 en las regiones nifH por dobles recombinantes.
2. Inserción del GDYN1 en las regiones nifH por recombinantes sencillas.

* La cepa tuvo una deleción espontánea, similar a la reportada por Martínez, et al., 1991.

. La cepa se amplificó en los subcultivos, por lo tanto no fue posible evaluar la frecuencia real de amplificación.

--- No se analizaron.

TABLA III

Diferentes tipos de rearreglos (A = Amplificación y D = Delección) en los pSim de las cepas analizadas de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. Caracterizados por la presencia de las regiones nifH en el pSim.

CEPA	INSERCIÓN DEL GDYN1 EN LA REGION <u>nifH</u>	NUMERO DE REARREGLOS OBSERVADOS					CURACION pSim	
		TIPO I		TIPO II	TIPO III	TIPO IV		TIPO V
		A	D	D	D	D		D
TAL-182	a	5	6	---	1	---	1	---
	b	5	12	---	---	---	---	---
	c	4	23	---	1	---	1	---
NITRAGIN-8251	a	7	9	---	---	---	---	9
	b	7	17	---	---	---	---	---
CIAT-984	a	1	---	---	15	3	6	---
BRASIL-5	a	---	---	---	---	16	---	---
F-14	a	---	---	3	---	---	---	---

TIPO I - nifHa x nifHb
 TIPO II - nifHa::GDYN1 x nifHb
 TIPO III - nifHb

TIPO IV - nifHb y nifHc
 TIPO V - sin nifH
 --- no se detecto rearreglo

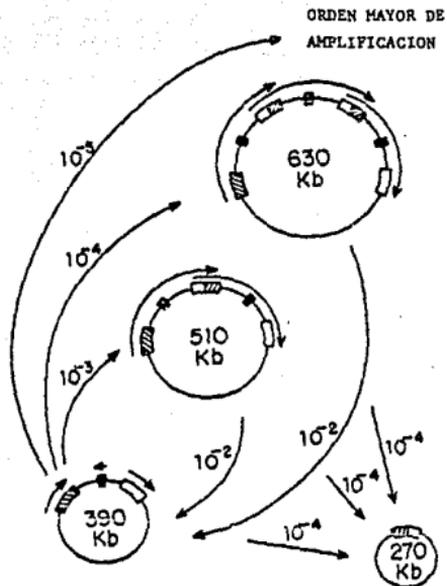


FIG. 1 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS REARREGLOS OBSERVADOS EN EL PLASMIDO SIMBIOTICO DE *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli CFN-42. LA LOCALIZACION Y EXTENSION RELATIVA DE LAS REGIONES *nifHa* (▨), *nifHb* (□), *nifHc* (■) Y LA BANDA RECOMBINANTE *nifH5'b/3'a* (▤); ESTAN INDICADAS POR LAS CAJAS Y LAS FLECHAS QUE TIENEN ARRIBA INDICAN LA DIRECCION DE TRANSCRIPCION DE CADA REGION. LAS FLECHAS MAYORES ALREDEDOR DE LOS CIRCULOS, INDICAN LA EXTENSION DE LA UNIDAD AMPLIFICADA. LOS NUMEROS ARRIBA DE LAS FLECHAS SON LAS FRECUENCIAS A LAS CUALES OCURREN LOS REARREGLOS RESPECTIVOS (TOMADO DE ROMERO, et.al., 1991. *J. Bacteriol.*, 173(8): 2435 - 2441)

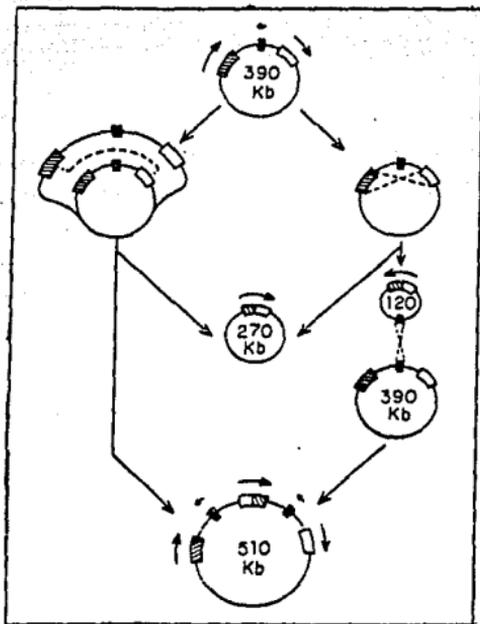


FIG. 2 MODELOS PARA LA GENERACION DE MOLECULAS DE PLASMIDOS CON UNA DELECCION O CON UNA DUPLICACION DE LA REGION DE 120 kb. EN LA PARTE DERECHA DE LA FIGURA , UN EVENTO DE RECOMBINACION INTRAMOLECULAR ENTRE LAS REGIONES nifHa y nifHb ORIGINAN UNA MOLECULA DE PLASMIDO DELETADO DE 270 kb Y UN PEQUEÑO CIRCULO DE 120 kb. PARA LA PARTE IZQUIERDA DE LA FIGURA UN EVENTO DE ENTRECruzAMIENTO DESIGUAL ENTRE SECUENCIAS nifH EN UN PLASMIDO REPLICANDOSE PARCIALMENTE ORIGINA DOS MOLECULAS DE PLASMIDOS DESPUES DE LA REPLICACION COMPLETA Y RESOLUCION, UNO CON UNA DELECCION Y EL OTRO CON UNA DUPLICACION (TOMADO DE ROMERO, et.al. 1991. J. Bacteriol., 173 (8) : 2435 - 2441).

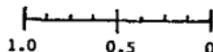
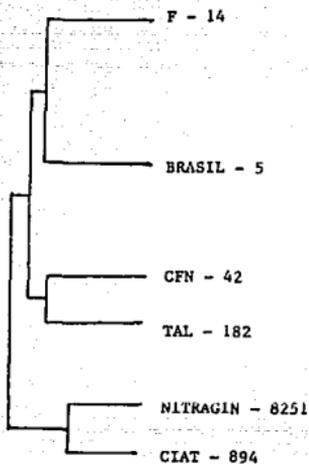
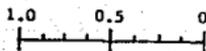


FIG. 3 DENDROGRAMA DE LAS RELACIONES GENETICAS DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* BASADOS EN LA VARIACION AELICA ELECTROFORETICAMENTE DETECTABLE PARA 15 LOCI DE ENZIMAS, DE LAS CEPAS ANALIZADAS EN ESTE ESTUDIO, LAS CUALES SE ENCUENTRAN DISTANCIADAS GENETICAMENTE ENTRE 0.55 y 0.75 (TOMADO DE Piñero, et.al. 1988. Appl. Environ. Microbiol., 54 : 2825 - 2832).

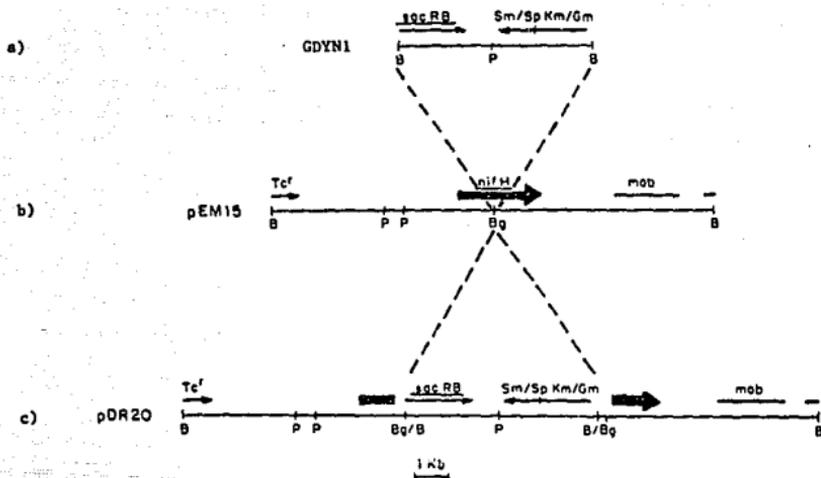


FIG. 4 MAPA FISICO DE LA CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pDR20. a) EL CASSETTE GDYNI DE 5.7KB FUE LIGADO AL UNICO SITIO *Bg* DEL pEM15. b) pEM15; ES UN PLASMIDO DERIVADO DEL pSUP205 EL CUAL CONTIENE CLONADA LA REGION *nifHa* DE *R.l.bv. phaseo11* GFN42. c) pDR20; TIENE CLONADO EL CASSETTE GDYNI EN EL CODON 147 DE LA SECUENCIA DE *nifHa* DEL pEM15. LOS SIMBOLOS *10cRB* SON EL LOCI ESTRUCTURAL Y REGULADOR PARA LA ENZIMA LEVANSUCRASA DE *B. subtilis*; LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS SON *Sm*, *Sp*, *Km*, *Gm* y *Tc*; *mob* ES EL ORIGEN DE TRANSFERENCIA DEL PLASMIDO RP4; *nifH* ES EL GEN ESTRUCTURAL PARA LA NITROGENASA REDUCTASA. LAS FLECHAS INDICAN LA DIRECCION DE LA TRANSCRIPCION. LOS SITIOS DE CORTE DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCION ESTAN SEÑALADOS: *B*, *BamHI*, *Bg*, *BglII* y *PstI*.

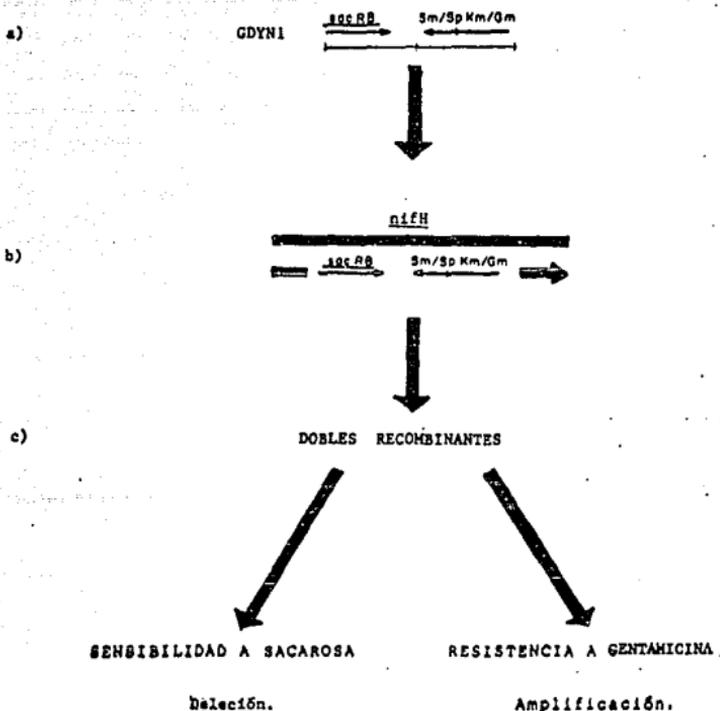


FIG. 5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA DETECTAR AMPLIFICACIONES Y DELECCIONES ENTRE *nifH* EN *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli. (a) CASSETTE GDYNI QUE CONFIERE SENSIBILIDAD A SACAROSA (*sacRB*) Y RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS (Sm, Sp, Km Y Gm). (b) SELECCION INICIAL CON LA INSERCCION DEL CASSETTE GDYNI EN LA REGION *nifH* MEDIANTE LA RESISTENCIA A GENTAMICINA. (c) CARACTERIZACION DE LAS DOBLES RECOMBINANTES Y (d) OBTENCION DE REARREGLOS POR SENSIBILIDAD A SACAROSA Y RESISTENCIA A GENTAMICINA.

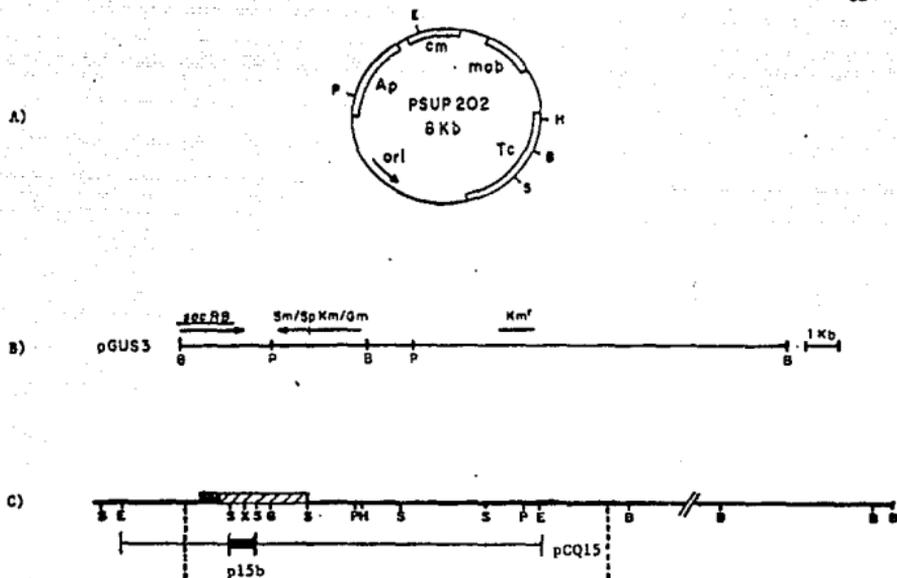


FIG. 6 HAPAS FISICOS DE LOS PLASMIDOS UTILIZADOS COMO DETECTORES. (A) ESQUEMA DEL PLASMIDO pSUP202 ori: ORIGEN DE REPLICACION; mob: SECUENCIA PARA MOVILIZACION; Y LOS GENES DETERMINANTES DE RESISTENCIA A TETRACICLINA (Tc), CLORAMPENICOL (Cm) Y AMPICILINA (Ap) (tomado de Sim6n, et al., 1983). (B) pGUS3 POSEE EL LOCI SacRB PARA LOS GENES ESTRUCTURALES DE LA LEVANSUCRASA DE B.subtilis Y LOS GENES DETERMINANTES DE RESISTENCIA A STREPTOMICINA (Sm), ESPECTINOMICINA (Sp), KANAMICINA (Km) Y GENTAMICINA (Gm) (tomado de Romero, et al., 1991). (C) REPRESENTA EL FRAGMENTO DE nifHa SUBCLONADO EN EL p15b, DONDE LAS LINEAS PUNTEADAS DENOTAN EL OPERON nifHDK LA CAJA  ES LA REGION DE OPERACION Y PROMOCION, LA CAJA  ES EL GENE nifHa (tomado de Quinto, et al., 1985). LOS SITIOS DE CORTE DE LAS ENZIMAS DE RESTRICION ESTAN SEÑALADOS: BamHI (B), EcoRI (E), PstI (P), HindIII (H), SalI (S) y XhoI (X).

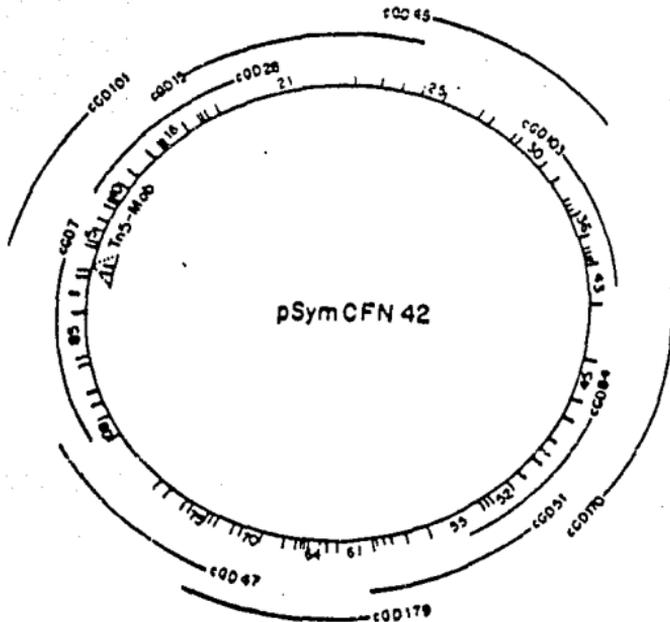


FIG. 7 MAPA CIRCULAR Y COSMIDOS DEL PLASMIDO SIMBIOTICO (pSIM) DE LA CEPA DE *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli CFN-42. LAS LINEAS RADIANDO DESDE EL CIRCULO REPRESENTAN SITIOS DE RESTRICCIÓN *Bam*HI, NUMERADAS SUCE-SI-VAMENTE EN DIRECCION DE LAS MANECILLAS DEL RELOJ, INICIANDO CON UNA BANDA QUE CONTIENE EL GENE *nifH α* . LOS ARCOS FUERA DEL PLASMIDO REPRESENTAN EL DNA DEL pSIM CLONADO EN UN SET DE 16 COSMIDOS (cGD) CUBRIENDO EL PLASMI-DO COMPLETO. EL pSIM Y LOS COSMIDOS ESTAN DIBUJADOS EN ESCALA DE 1kb = 0.93° (TOMADO DE Girard, et. al. 1991. J. Bacteriol., 173 (8) : 2411 - 2419).

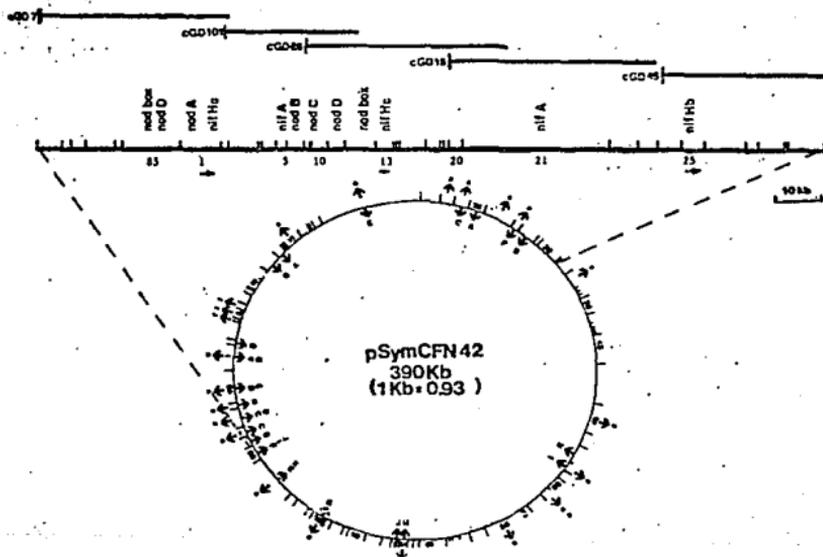


FIG. 8 MAPA FISICO DEL pSIM DE *R. l.* bv. phaseoli CFN-42. EL MAPA ESTA SUBDIVIDIDO EN LOS FRAGMENTOS BamHI QUE LO COMPONEN. LAS FLECHAS INTERNAS REPRESENTAN LAS FAMILIAS REITERADAS DENTRO DEL pSIM. CADA FAMILIA SE IDENTIFICA CON LETRAS MAYUSCULAS (A a K); LA FAMILIA A CORRESPONDE A nifH. LAS FLECHAS EXTERNAS INDICAN BANDAS CON REITERACIONES COMUNES AL PLASMIDO INDICADO (a a f) DE LA CFN-42, EN LA ZONA EXTENDIDA SE MUESTRA LA LOCALIZACION DE ALGUNOS GENES RELEVANTES PARA LA SIMBIOSIS, ASI COMO LA EXTENSION DE LOS COSMIDOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO PARA DETECTAR LOS DISTINTOS REARREGLOS.

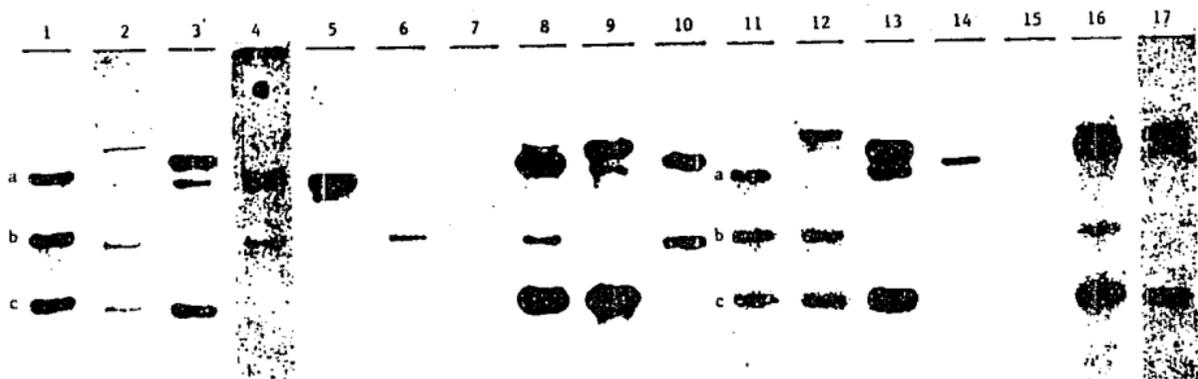


FIG. 9 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON *Bam*HI E HIBRIDIZADO CON EL DETECTOR DE *nifH*, DE LAS CEPAS TAL-182 Y NITRAGIN-8251 DE *R. phaseoli* SUBTIPO I. PORTANDO DELECCIONES O AMPLIFICACIONES.

LOS CARRILES DEL 1 AL 10 CORRESPONDEN A LA CEPA TAL-182; EL 1 ES LA CEPA SILVESTRE, DEL 2 AL 4 SON CEPAS CON EL CASSETTE GDYNI EN CADA REGION *nifH* (a,b y c) RESPECTIVAMENTE, EL 5 ES UNA DELECCION TIPO I, EL 6 ES UNA DELECCION TIPO IV, EL 7 ES UNA DELECCION TIPO V, EL 8 ES UNA TRIPLICACION (*nifHa*::GDYNI), EL 9 ES UNA AMPLIFICACION DE SEIS VECES (*nifHb*::GDYNI) Y EL 10 ES UNA AMPLIFICACION DE SIETE VECES (*nifHc*::GDYNI). LOS CARRILES DEL 11 AL 17 CORRESPONDEN A LA CEPA NITRAGIN-8251; EL 11 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 12 Y 13 SON CEPAS CON EL CASSETTE GDYNI EN LAS REGIONES *nifHa* y b RESPECTIVAMENTE, EL 14 ES UNA DELECCION TIPO I, EL 15 ES UNA CURACION DEL *pSim*, EL 16 ES UNA AMPLIFICACION DE CINCO VECES (*nifHa*::GDYNI) Y EL 17 ES UNA TRIPLICACION (*nifHb*::GDYNI). LAS LETRAS DE LA IZQUIERDA SEÑALAN LAS BANDAS DE LAS REITERACIONES *nifH* DE LAS CEPAS SILVESTRES.

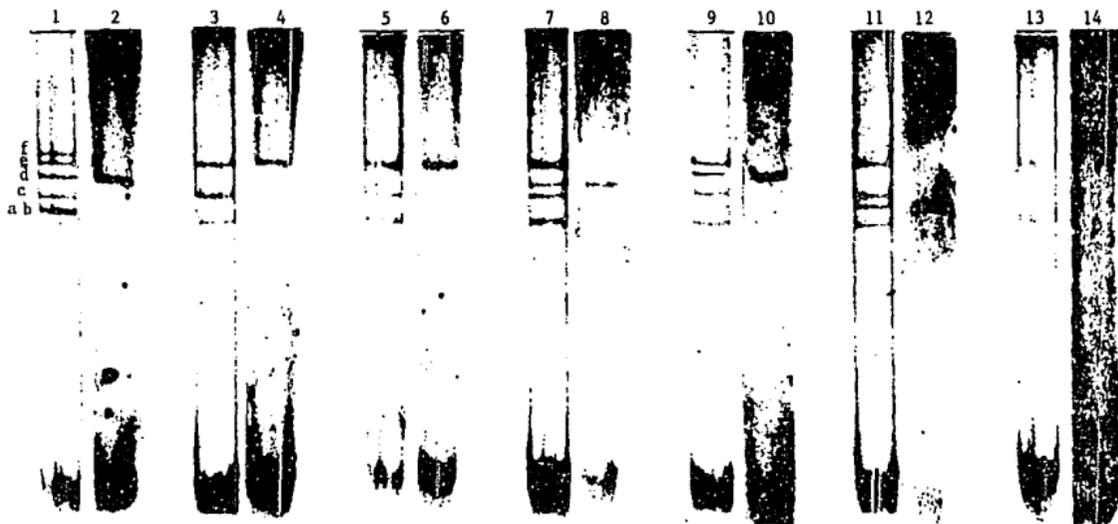


FIG. 10

PERFILES DE PLASMIDOS Y LOCALIZACIÓN DE LOS p_{Sim} DE LAS CEPAS DERIVADAS DE LA TAL-182 DE *R. phaseoli* SUBTIPO I. LOS NUMEROS NONES SON LOS PERFILES DE PLASMIDOS TENIDOS CON BROMURO DE ETIDIO Y LOS NUMEROS PARES SON LOS SOUTHERN CORRESPONDIENTES DE LOS ECKHARDT HIBRIDIZADOS CON EL DETECTOR DE *nifH*. LAS LETRAS A LA IZQUIERDA DEL PRIMER CARRIL MARCAN LA POSICION DE LOS PLASMIDOS DE LA CEPA CFN42 Y LOS TAMAÑOS APROXIMADOS SON 150. Kb (a,b), 270 Kb (c), 390 Kb (p_{Sim} , d), 510 Kb (e) y 630 Kb (f). LOS CARRILES, 3 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 5 ES LA CEPA CON EL CASSETTE GDYN1 INSERTO EN CUALQUIERA DE LAS REGIONES *nifH*, EL 7 ES UNA DELECIÓN TIPO I, EL 9 ES UNA DELECIÓN TIPO III, EL 11 ES UNA DELECIÓN TIPO V Y EL 13 ES UNA AMPLIFICACIÓN DE *nifHa::GDYN1* (VER FIG. 9).

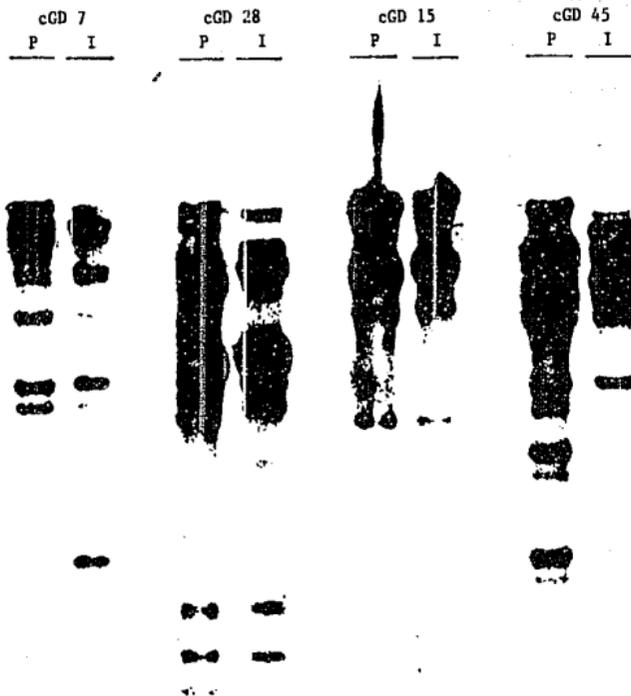


FIG. 11 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA TAL-182 DE *R. phaseoli* SUBTIPO 1. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA (*nifH*_{a::GDYNI}) Y EL NUMERO I CORRESPONDE A UNA AMPLIFICACION DE TRES VECES (*nifH*_{5'b/3'a::GDYNI}).

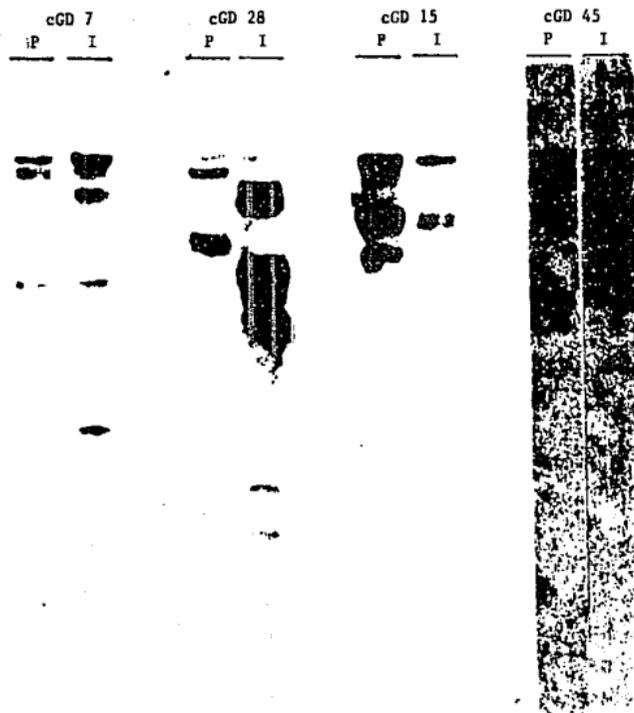


FIG. 12 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON *Bam*HI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA TAL-182 DE *R. phaseoli* SUBTIPO I. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA (*nifHb::GDYN1*) Y EL NUMERO I CORRESPONDE A UNA AMPLIFICACION DE SEIS VECES (*nifH5^b/3^a::GDYN1*).

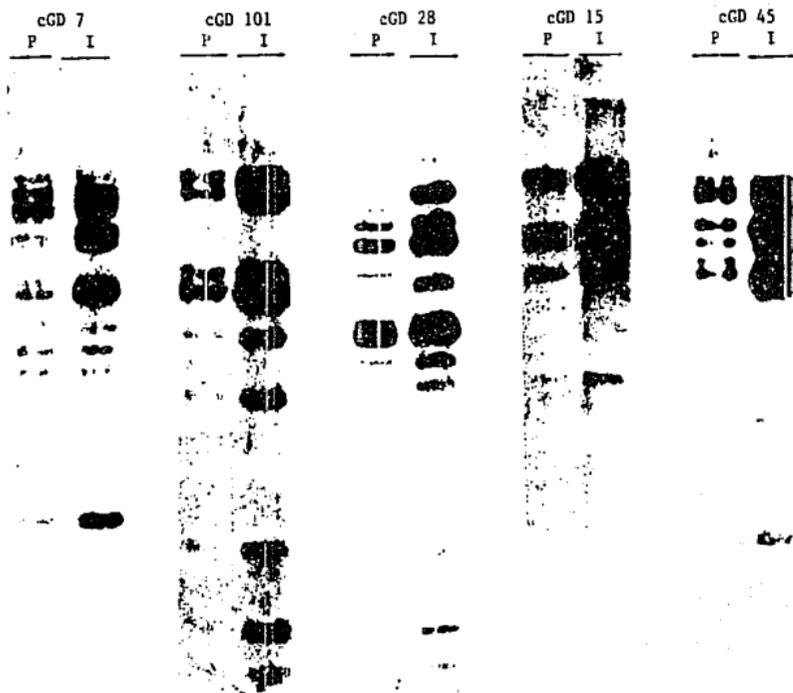


FIG. 13 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA TAL-182 DE *R. phaseoli* SUBTIPO I. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA (*nifHc::GDYN1*) Y EL NUMERO I CORRESPONDE A UNA AMPLIFICACION DE SIETE VECES (*nifH5'b/3'a*).

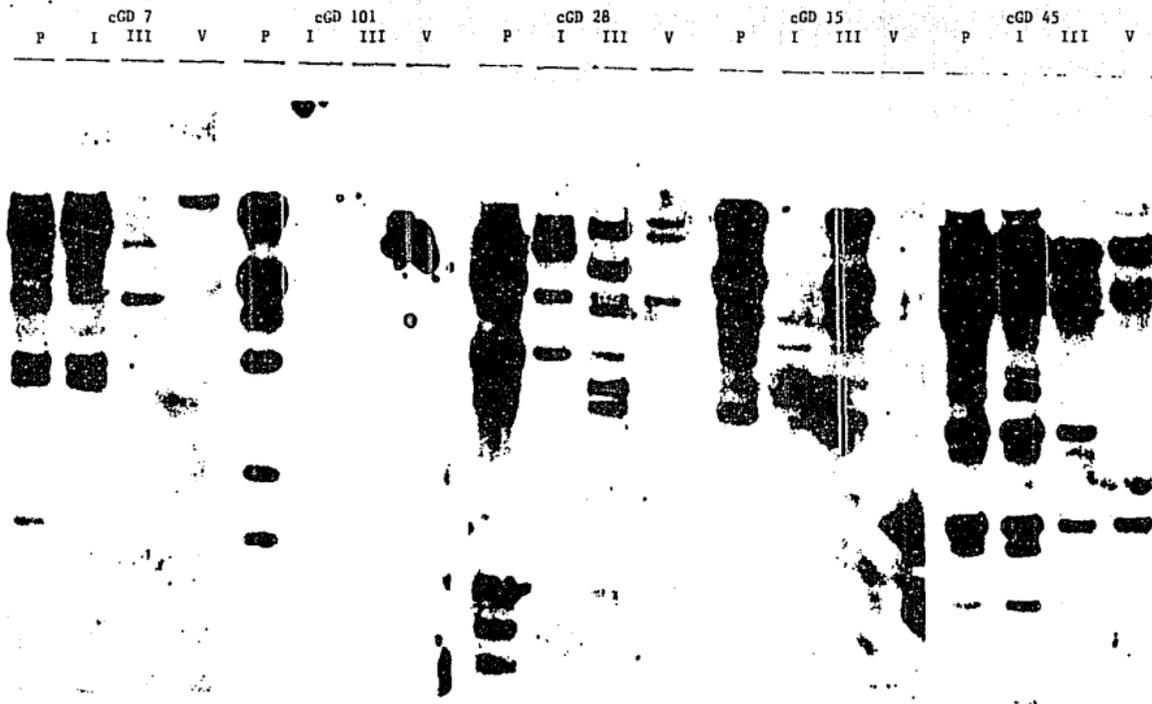


FIG. 14 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 Y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA TAL-182 SUBTIPO I. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA Y LOS NUMEROS I, III Y V CORRESPONDEN AL TIPO DE DELECCION.

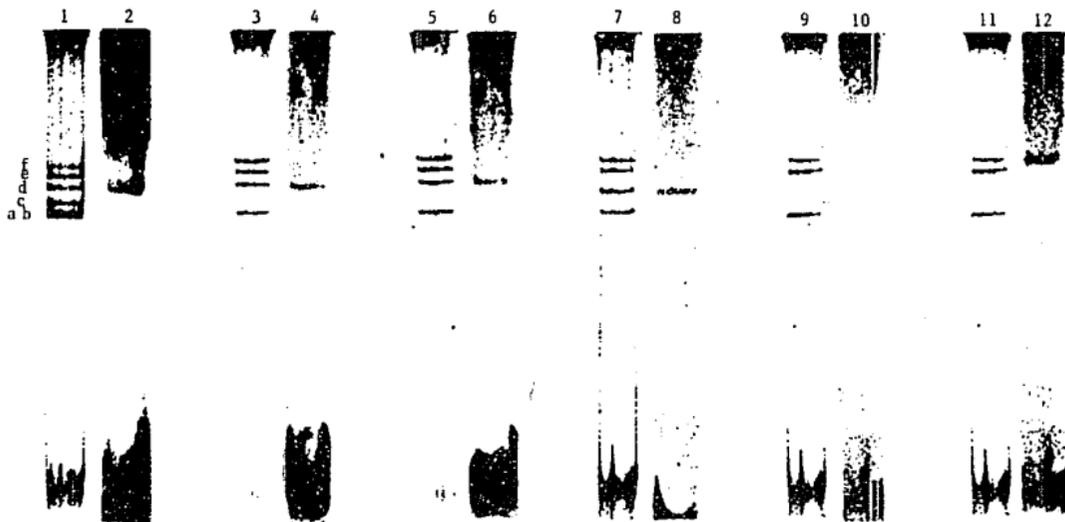


FIG. 15 PERFILES DE PLASMIDOS Y LOCALIZACION DE LOS p_{Sim} DE LAS CEPAS DERIVADAS DE LA NITRAGIN-8251 DE *R. phaseoli* SUBTIPO I. LOS NUMEROS NONES SON LOS PERFILES DE PLASMIDOS TEÑIDOS CON BROMURO DE ETIDIO Y LOS NUMEROS PARES SON LOS SOUTHERN CORRESPONDIENTES DE LOS ECKHARDT HIBRIDIZADOS CON EL DETECTOR DE *nifH*. LAS LETRAS A LA IZQUIERDA DEL PRIMER CARRIL MARCAN LA POSICION DE LOS PLASMIDOS DE LA CEPA CFN42 Y LOS TAMAÑOS APROXIMADOS SON 150 Kb (a,b), 270 Kb (c), 390 Kb (p_{Sim} , d), 510 Kb (e) y 630 Kb (f). LOS CARRILES, 3 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 5 ES LA CEPA CON EL CASSETTE GDYNI INSERTO EN *nifH* (a o b), EL 7 ES UNA DELECCION TIPO I, EL 9 ES UNA CURACION Y EL 11 ES UNA AMPLIFICACION DE *nifHa::GDYNI* (VER FIG. 9).

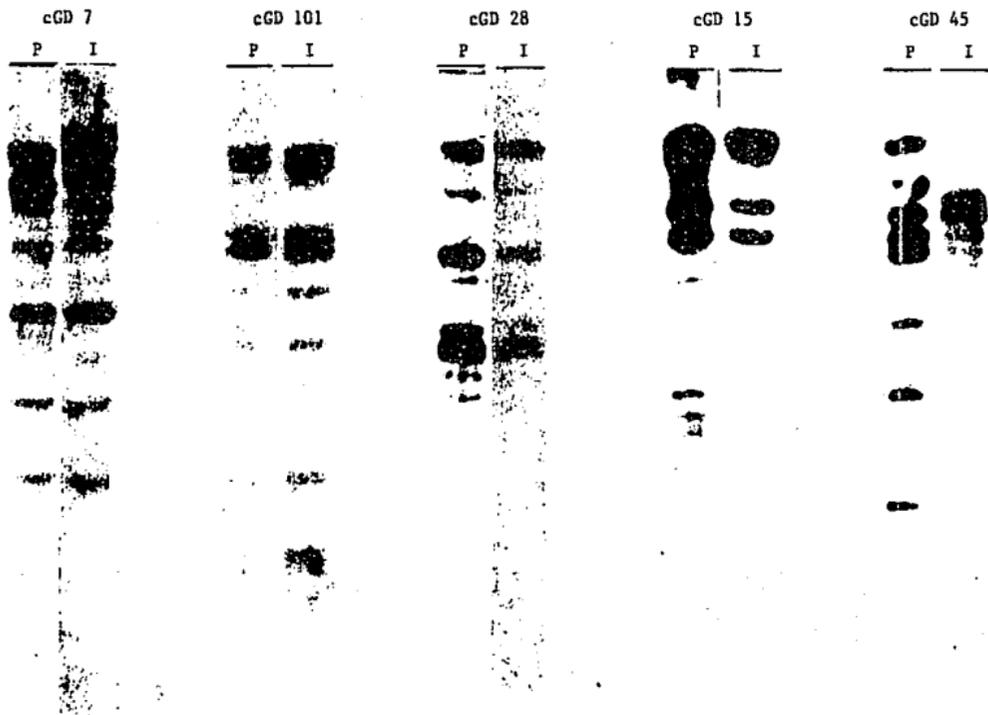


FIG. 16 ANÁLISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA NITRAGIN-8251 DE *R. phaseoli* SUBTIPO I. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA (*nifHa::GDYN1*) Y EL NUMERO I CORRESPONDE A UNA AMPLIFICACION DE CINCO VECES (*nifH5^Tb/3'a::GDYN1*).

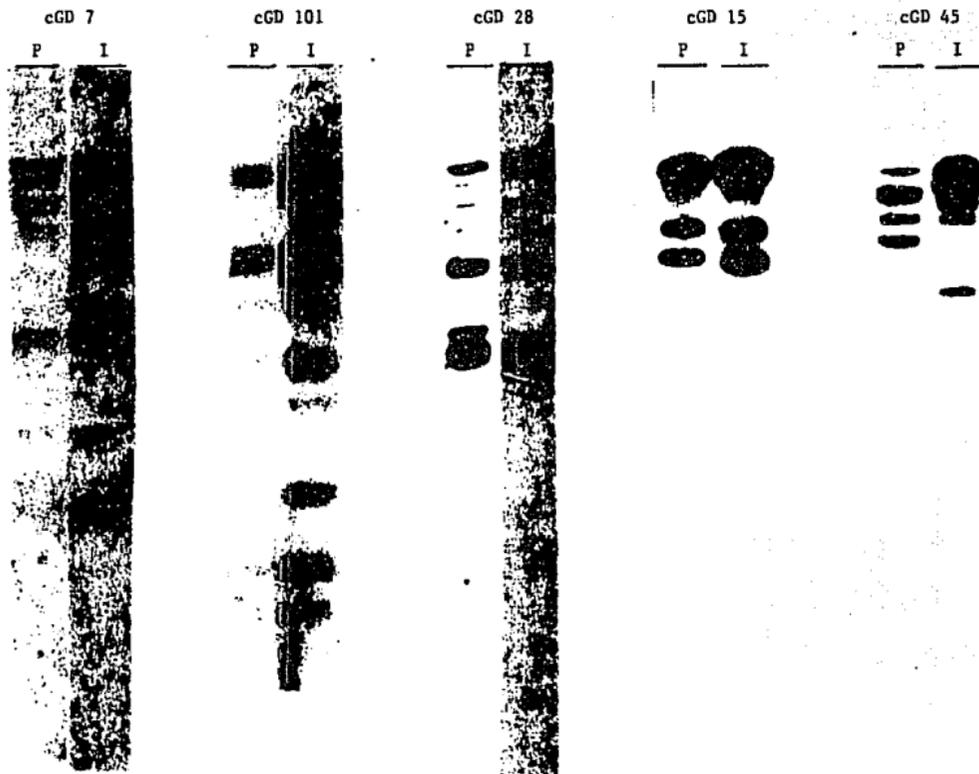


FIG. 17 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON *Bam*HI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA NITRAGIN-8251 DE *R. phaseoli* SUBTIPO I. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA (*nifHb::GDYN1*) Y EL NUMERO I CORRESPONDE A UNA AMPLIFICACION DE TRES VECES (*nifH5'5/3'a::GDYN1*).

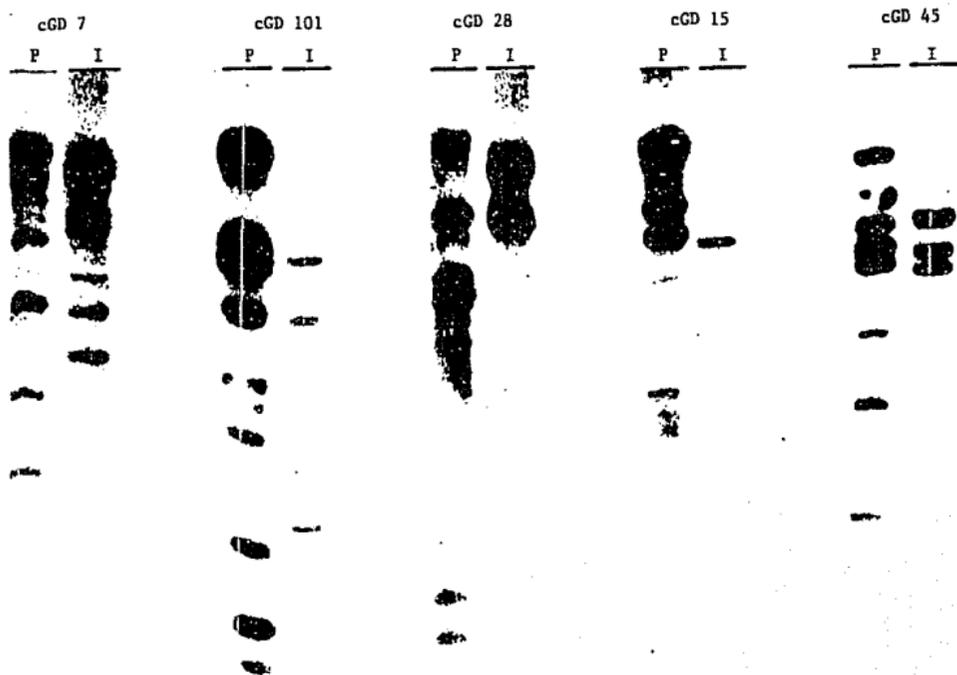


FIG.18 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA NITRAGIN-8251 SUBTIPO I. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA Y EL NUMERO I CORRESPONDE AL TIPO DE DELECCION.



FIG. 19 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DICERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CON EL DETECTOR *nifH*, DE LAS CEPAS CIAT-894: SUBTIPO II, BRASIL-5: SUBTIPO III Y F-14: SUBTIPO IV DE *R.phaseoli* PORTANDO DELECIONES O AMPLIFICACIONES.

LOS CARRILES DEL 1 AL 6 CORRESPONDEN A LA CEPA CIAT-894; EL 1 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 2 ES LA CEPA CON EL CASSETTE GDYNI EN *nifHa*, EL 3 ES UNA DELECCION TIPO III, EL 4 ES UNA DELECCION TIPO IV, EL 5 ES UNA DELECCION TIPO V Y EL 6 ES UNA TRIPLICACION (*nifHa::GDYNI*) LOS CARRILES DEL 7 AL 9 CORRESPONDEN A LA CEPA BRASIL-5; EL 7 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 8 ES LA CEPA CON EL CASSETTE GDYNI EN *nifHa* Y EL 9 ES UNA DELECCION TIPO IV. LOS CARRILES DEL 10 AL 12 CORRESPONDEN A LA CEPA F-14; EL 10 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 11 ES LA CEPA CON EL CASSETTE GDYNI EN *nifHa* Y EL 12 ES UNA DELECCION TIPO I. LAS LETRAS A LA IZQUIERDA SEÑALAN LAS BANDAS DE LAS REITERACIONES *nifH* DE LAS CEPAS SILVESTRES.

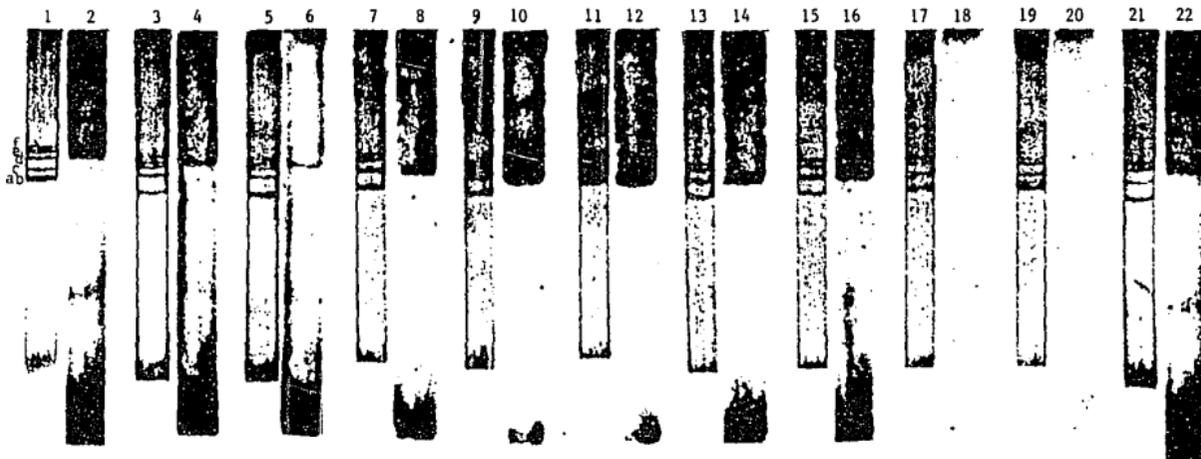


FIG. 20 PERFILES DE PLASMIDOS Y LOCALIZACION DE LOS pSim DE LAS CEPAS DERIVADAS DE LA CIAT-894 DE R. phaseoli SUBTIPO II. LOS NUMEROS NONES SON LOS PERFILES DE PLASMIDOS TENIDOS CON BROMURO DE ETIDIO Y LOS NUMEROS PARES SON LOS SOUTHERN CORRESPONDIENTES DE LOS ECKHARDT HIBRIDIZADOS CON EL DETECTOR DE nifH. LAS LETRAS A LA IZQUIERDA DEL PRIMER CARRIL MARCAN LA POSICION DE LOS PLASMIDOS DE LA CEPA CFN42 Y LOS TAMAÑOS APROXIMADOS SON 150 Kb (a,b), 270 Kb (c), 390 Kb (pSim, d), 510 Kb (e) y 630 Kb (f). LOS CARRILES, 3 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 5 ES LA CEPA CON EL CASSETTE GDYNI INSERTADO EN nifHa, EL 7 ES UNA DELECCION TIPO III-1, EL 9 ES UNA DELECCION TIPO III-2, EL 11 ES UNA DELECCION TIPO III-3, EL 13 ES UNA DELECCION TIPO IV-1, EL 15 ES UNA DELECCION TIPO IV-2, EL 17 ES UNA DELECCION V-1, EL 19 ES UNA DELECCION TIPO V-2 Y EL 21 ES UNA AMPLIFICACION DE nifHa::GDYNI (VER FIG.19).

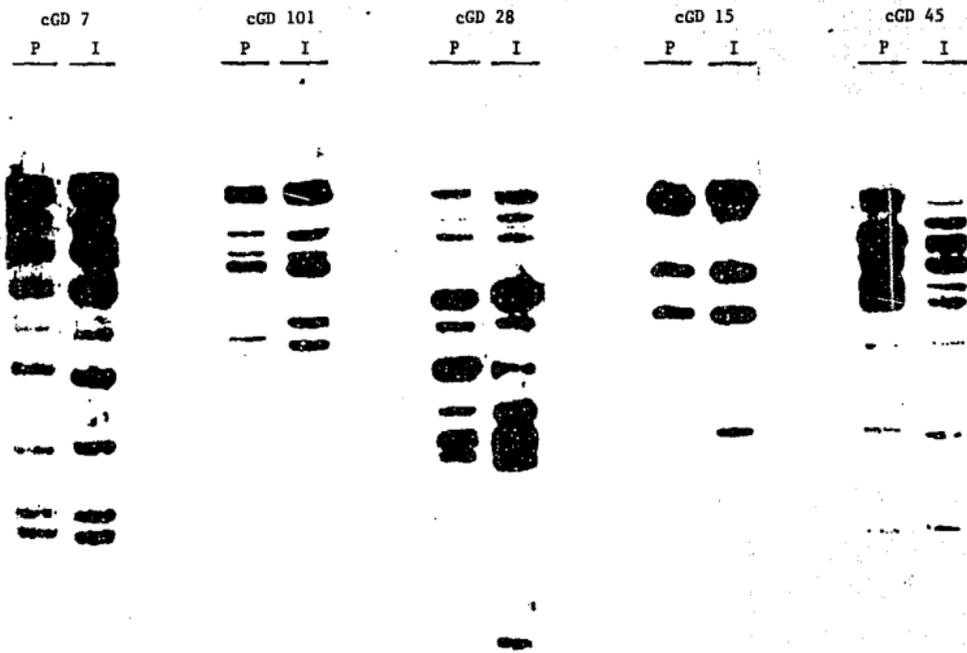


FIG. 21 ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON *Bam*HI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA CIAT-894 DE *R. phaseoli* SUBTIPO II. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA (*nifHba::GDYNI*) Y EL NUMERO I CORRESPONDE A UNA AMPLIFICACION DE TRES VECES (*nifH5'^b/3'a::GDYNI*).

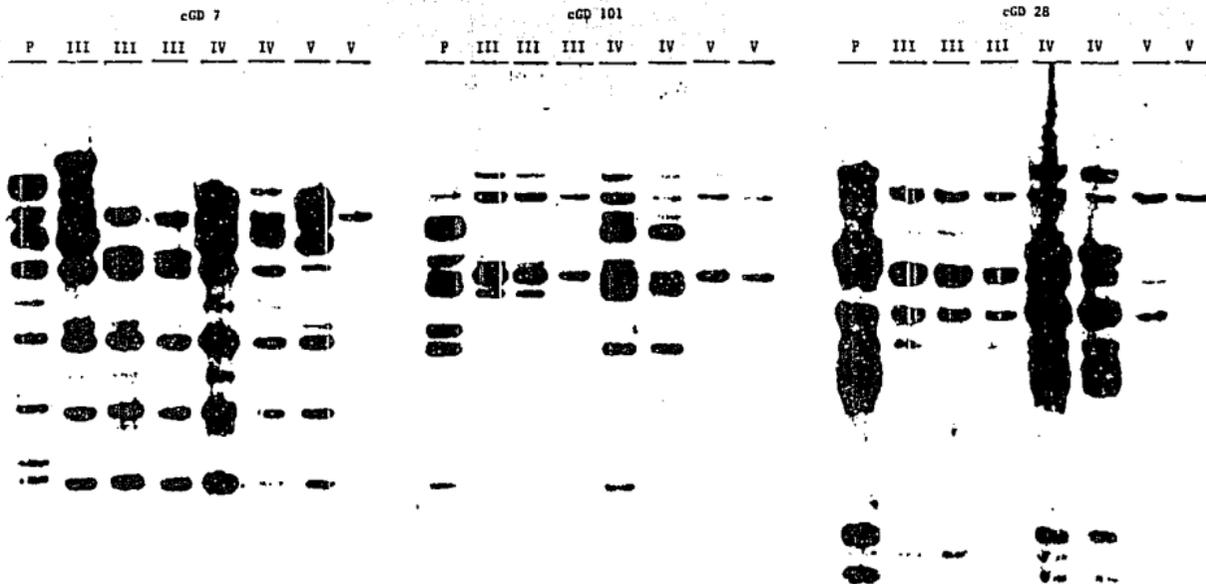


FIG. 22

ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON *Bam*HI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA CIAT-894 DE *E. phaseoli* SUETIPO II. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA Y LOS NUMEROS III, IV Y V CORRESPONDEN AL TIPO DE DELECCION.

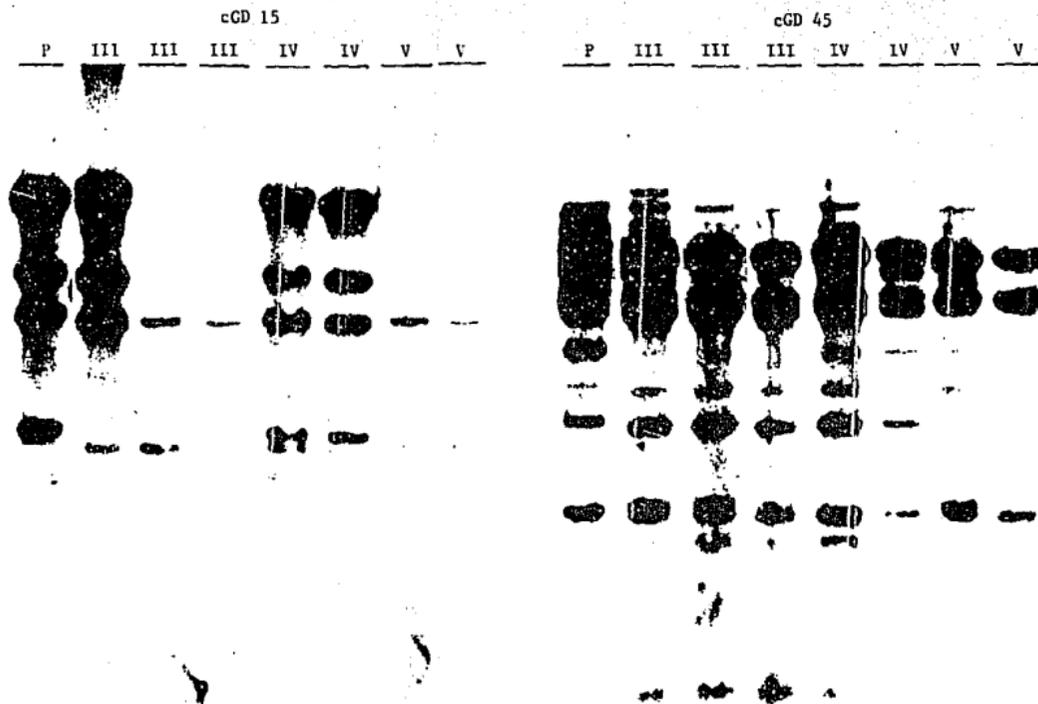


FIG. 22

ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DICERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA CIAT-894 DE *R. phaseoli* SUBTIPO II. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA Y, LOS NUMEROS III, IV Y V CORRESPONDEN AL TIPO DE DELECCION.

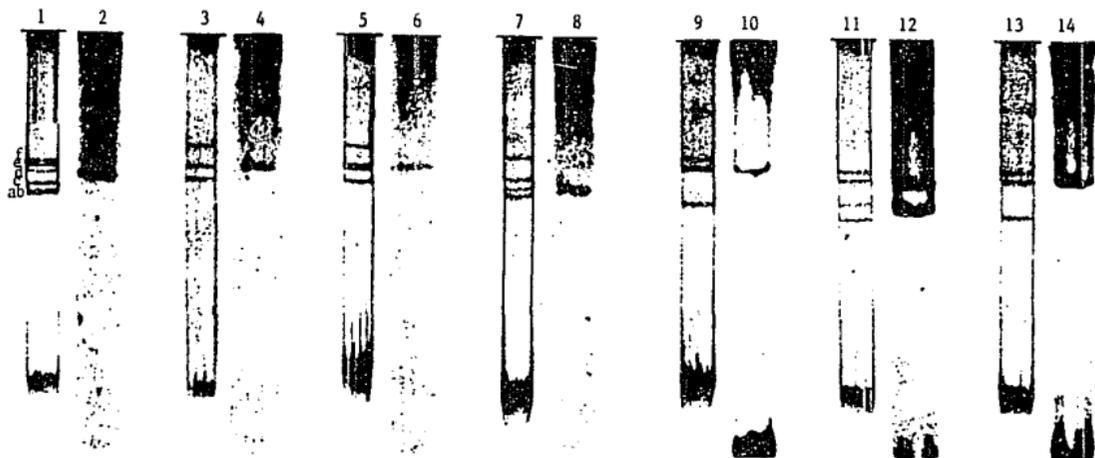


FIG. 23 PERFILES DE PLASMIDOS Y LOCALIZACION DE LOS pSim DE LAS CEPAS DERIVADAS DE LA BRASIL-5 SUBTIPO III Y DE LA F-14 SUBTIPO IV DE *R. phaseoli*. LOS NUMEROS NONES SON LOS PERFILES DE PLASMIDOS TENIDOS CON BROMURO DE ETIDIO Y LOS NUMEROS PARES SON LOS SOUTHERN CORRESPONDIENTES DE LOS ECKHARDT HIBRIDIZADOS CON EL DETECTOR DE nifH. LAS LETRAS A LA IZQUIERDA DEL PRIMER CARRIL MARCAN LA POSICION DE LOS PLASMIDOS DE LA CEPA CFN42 Y LOS TAMAÑOS APROXIMADOS SON 150 kb (a,b), 270 kb (c), 390 kb (pSim, d), 510 kb (e) y 630 kb (f). LOS CARRILES DEL 3 AL 8 CORRESPONDEN A LA BRASIL-5, EL 3 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 5 ES LA CEPA CON EL CASSETTE INSERTO EN nifHa Y EL 7 ES UNA DELECCION TIPO IV. LOS CARRILES DEL 9 AL 14 CORRESPONDEN A LA F-14, EL 9 ES LA CEPA SILVESTRE, EL 11 ES LA CEPA CON EL CASSETTE INSERTO EN nifHa Y EL 13 ES UNA DELECCION TIPO I (VER FIG. 19).

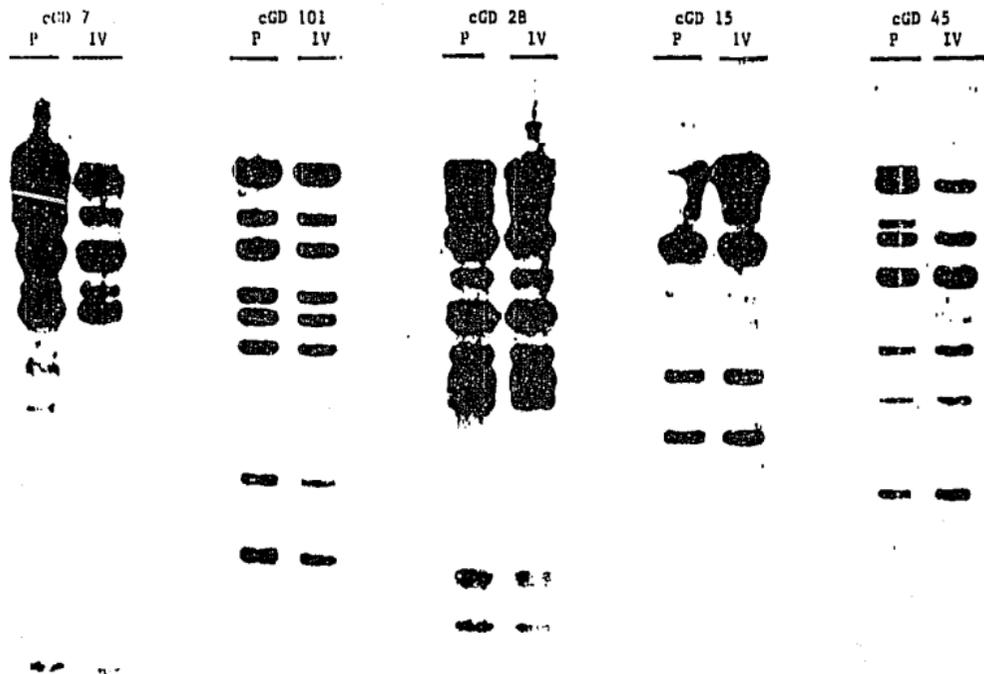


FIG. 24

ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA BRASIL-5 DE *R. phaseoli* SUBTIPO III. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA Y EL NUMERO IV CORRESPONDE AL TIPO DE DELECCION.

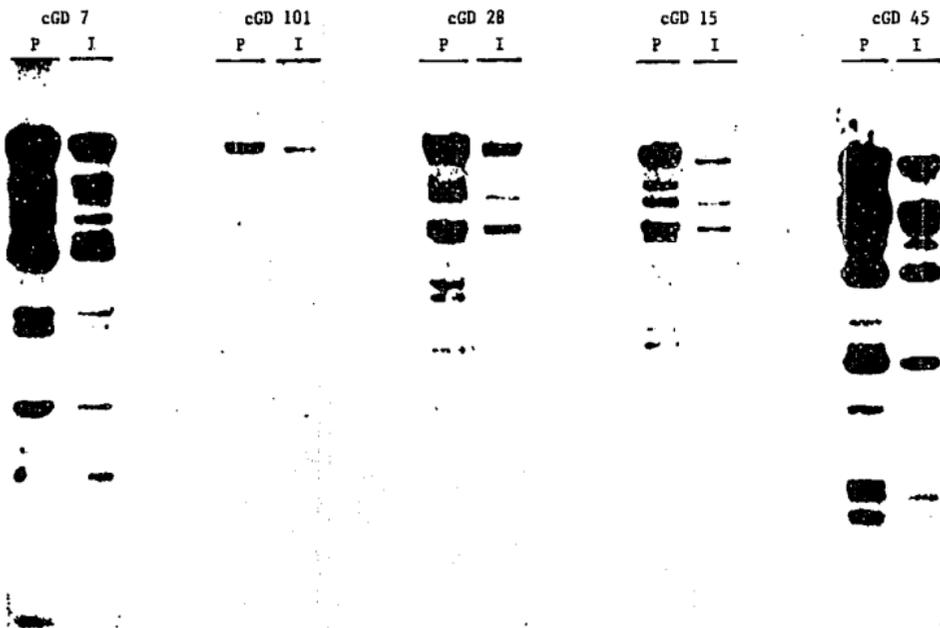
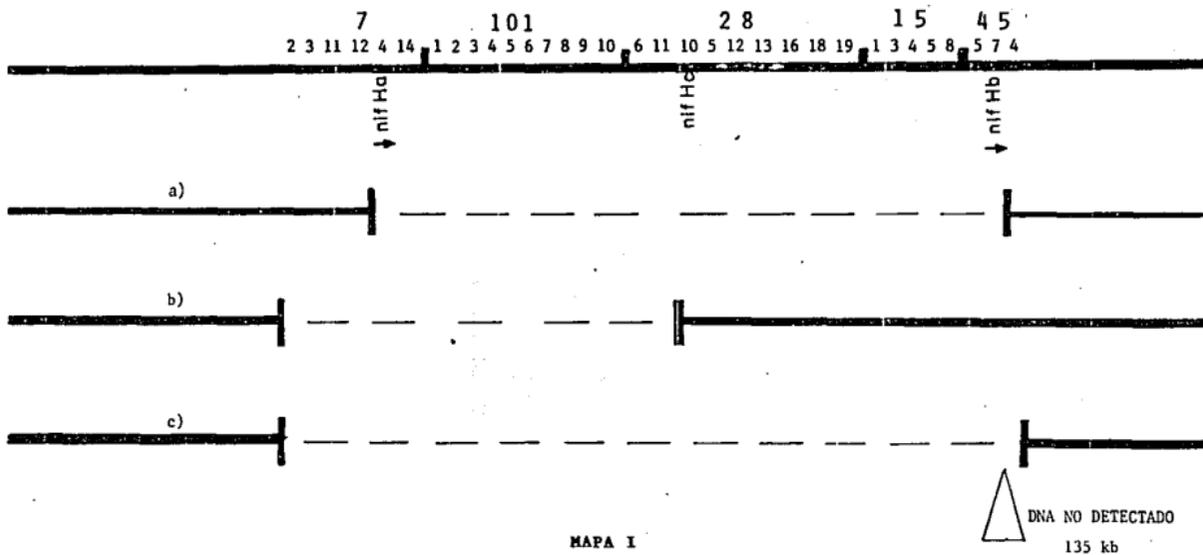


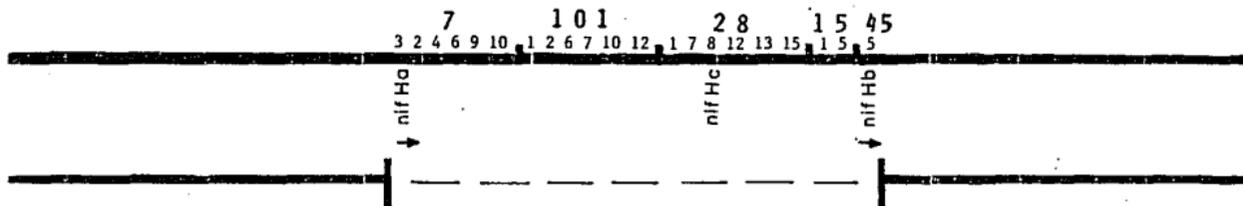
FIG. 25

ANALISIS POR HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN DEL DNA GENOMICO DIGERIDO CON BamHI E HIBRIDIZADO CONTRA LOS COSMIDOS cGD7, 101, 28, 15 y 45 (VER FIG. 8) DE LA CEPA F-14 DE *R. phaseoli* SUBTIPO IV. LOS CARRILES, P REPRESENTAN A LA CEPA PROGENITORA Y EL NUMERO I CORRESPONDE AL TIPO DE DELECCION.



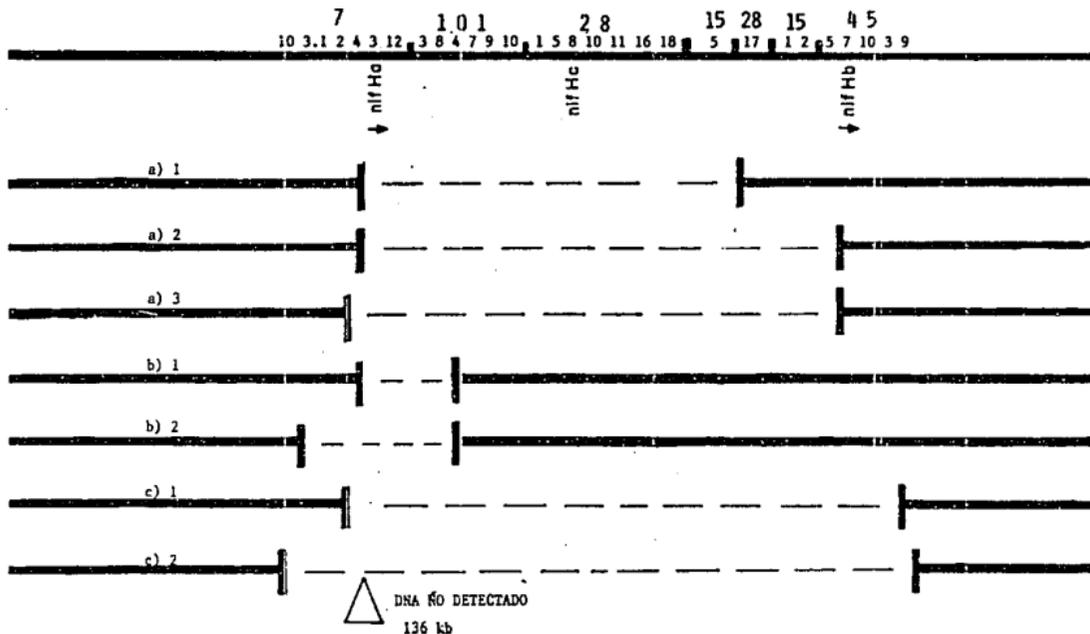
MAPA I

MAPA FISICO DE LAS DELECIONES DEL pSim AISLADAS PARA LA CEPA TAL-182. LAS LINEAS CONTINUAS REPRESENTAN LAS REGIONES DEL pSim QUE NO PARTICIPAN EN LOS REARREGLOS. LAS LINEAS INTERRUMPIDAS REPRESENTAN LA EXTENSION DE CADA DELECCION; a) DELECCION TIPO I (nifHa x nifHb) 136 KB DELETADAS; b) DELECCION TIPO III (nifHb) 94 KB DELETADAS; c) DELECCION TIPO V (SIN nifH) 170 Kb DELETADAS. LOS NUMEROS ENTRE LOS PARENTESIS REPRESENTAN A LOS COSMIDOS DELETADOS Y LOS NUMEROS SOBRE LA LINEA REPRESENTAN LAS BANDAS PERDIDAS EN CADA COSMIDO.



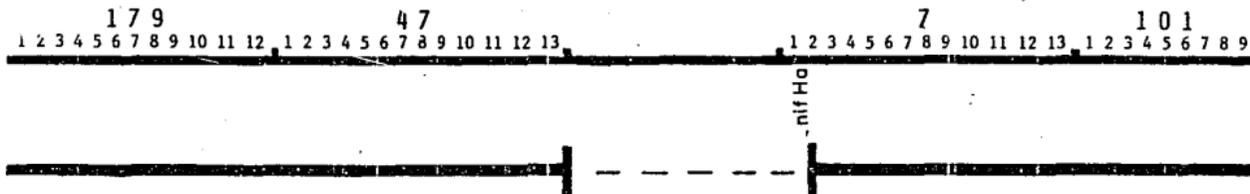
MAPA II

MAPA FISICO DE LAS DELECIONES DEL pS_{1m} AISLADAS PARA LA CEPA NITRAGIN-8251. LAS LINEAS CONTINUAS REPRESENTAN LAS REGIONES DEL pS_{1m} QUE NO PARTICIPAN EN LOS REARRREGLOS. LAS LINEAS INTERRUMPIDAS REPRESENTAN LA EXTENSION DE CADA DELECCION; a) DELECCION TIPO I (nifHa x nifHb) 131KB DELETADAS. LOS NUMEROS ENTRE LOS PARENTESIS REPRESENTAN A LOS COSMIDOS DELETADOS Y LOS NUMEROS SOBRE LA LINEA REPRESENTAN LAS BANDAS PERDIDAS EN CADA COSMIDO.



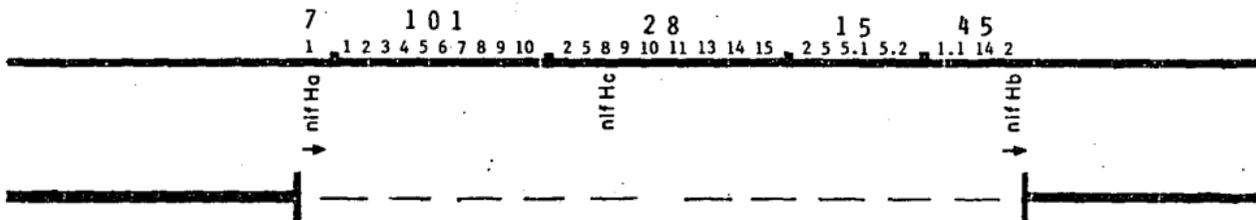
MAPA III

MAPA FÍSICO DE LAS DELECIONES DEL pSim AISLADAS PARA LA CEPA CIAT-894. LAS LINEAS CONTINUAS REPRESENTAN LAS REGIONES DEL pSim QUE NO PARTICIPAN EN LOS REARREGLOS. LAS LINEAS INTERRUMPIDAS REPRESENTAN LA EXTENSIÓN DE CADA DELECION; a) DELECION TIPO III (nifHb); SUBTIPO 1 59KB DELETADAS, SUBTIPO 2 95KB DELETADAS, SUBTIPO 3 104KB DELETADAS b) DELECION TIPO IV (nifHb y nifHc); SUBTIPO 1 11KB DELETADAS, SUBTIPO 2 47KB DELETADAS c) DELECION TIPO V (sin nifH); SUBTIPO 1 105KB DELETADAS, SUBTIPO 2 135KB DELETADAS. LOS NUMEROS ENTRE LOS PARENTESIS REPRESENTAN A LOS COSMIDOS DELETADOS Y LOS NUMEROS SOBRE LA LINEA REPRESENTAN LAS BANDAS PERDIDAS EN CADA COSMIDO.



MAPA IV

MAPA FISICO DE LAS DELECCIONES DEL pSim AISLADAS PARA LA CEPA BRASIL-5. LAS LINEAS CONTINUAS REPRESENTAN LAS REGIONES DEL pSim QUE NO PARTICIPAN EN LOS REARREGLOS. LAS LINEAS INTERRUMPIDAS REPRESENTAN LA EXTENSION DE CADA DELECCION; a) DELECCION TIPO III (nifHb) 180KB DELETADAS. LOS NUMEROS ENTRE LOS PARENTESIS REPRESENTAN A LOS COSMIDOS DELETADOS Y LOS NUMEROS SOBRE LA LINEA REPRESENTAN LAS BANDAS PERDIDAS EN CADA COSMIDO.



MAPA V

MAPA FISICO DE LAS DELECIONES DEL pSim AISLADAS PARA LA CEPA F-14. LAS LINEAS CONTINUAS REPRESENTAN LAS REGIONES DEL pSim QUE NO PARTICIPAN EN LOS REARREGLOS. LAS LINEAS INTERRUMPIDAS REPRESENTAN LA EXTENSION DE CADA DELECCION; a) DELECCION TIPO II (nifHa::GDYNI x nifHb) 182KB DELETADAS. LOS NUMEROS ENTRE LOS PARENTESIS REPRESENTAN A LOS COSMIDOS DELETADOS Y LOS NUMEROS SOBRE LA LINEA REPRESENTAN LAS BANDAS PERDIDAS EN CADA COSMIDO.