



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

CLONACION DEL LOCUS QUE COMPLEMENTA A UNA MUTANTE DE R. phaseoli ALTERADA EN EL CATABOLISMO DE GLUTAMATO Y LA FIJACION DE NITROGENO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: MARIA GISELA DU PONT DE LARA



MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1994



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.

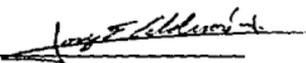
JURADO

Presidente	Prof. HOMERO HERNANDEZ MONTES
Vocal	Prof. JORGE FERNANDO CALDERON JIMENEZ
Secretario	Prof. GUILLERMO GONZALEZ VARGAS
1er. suplente	Prof. MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA
2do. suplente	Prof. HORTENSIA EUGENIA LEMUS DIAZ

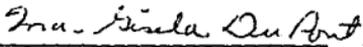
Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

ASESOR:

DR. JORGE FERNANDO CALDERON JIMENEZ 

SUSTENTANTE:

MARIA GISELA DU PONT DE LARA 

CON CARIÑO Y AGRADECIMIENTO

A mis padres: Raquel y Juan Mario.

A mis hermanos: Juan Mario y Juan Claudio.

A mi tía: Gloria.

A mi esposo: Jorge.

A mis hijas: Estefanía y Elizabeth.

A mis suegros: Emilia y Guillermo.

A mis familiares, compañeros y amigos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

A todos aquellos que de alguna forma participaron en mi formación profesional.

INDICE

	PAGINA	
I	INTRODUCCION.	
	El nitrógeno	1
	El ciclo del nitrógeno	2
	Amonificación y mineralización	2
	Inmovilización o asimilación	4
	Nitrificación	5
	Desnitrificación	6
	Reducción	7
	Fijación simbiótica de nitrógeno	10
	Género <u>Rhizobium</u>	10
	Clasificación de los Rhizobia	12
	Proceso de nodulación	13
	Intercambio planta-bacteria	16
	Genes <u>nif</u>	17
	Vías de asimilación de amonio	18
II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
III	OBJETIVO	26
IV	MATERIAL Y METODOS	
	Cepas	28
	Medios de cultivo	28
	Curvas de crecimiento	30
	Determinación de proteína	32
	Actividad enzimática de GDH	35
	Actividad enzimática de ADH	39
	Conjugación	40
	DNA de plásmido	41
	Gel de agarosa	45
	DNA total	47
	Digestión	49
	Transferencia tipo Southern	51
	Marcaje radiactivo de DNA	53
	Hibridización	55
	Simbiosis planta-bacteria	58
	Actividad enzimática de nitrogenasa	62
	Fenotipo de bacteroides	64

	PAGINA
V RESULTADOS Y DISCUSION	66
VI CONCLUSIONES	81
VII BIBLIOGRAFIA	83

INTRODUCCION.

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes que existen en la naturaleza ya que después del carbono, el hidrógeno y el oxígeno, es el elemento más abundante en los seres vivos. El nitrógeno es indispensable ya que forma parte de la mayoría de las macromoléculas esenciales para el crecimiento celular tales como proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas sobre las cuales se basa toda la vida, por consiguiente es un componente básico del protoplasma de plantas, animales y microorganismos (101).

Sin embargo, el nitrógeno, junto con el fósforo, es de los elementos que se encuentran en menor cantidad en la corteza terrestre, ocupa el 17° lugar en abundancia y se encuentra principalmente en forma de sales como nitratos (NO_3) y nitritos (NO_2), de los cuales, la mayor parte es lavado por las lluvias hacia estratos profundos donde difícilmente pueden ser aprovechados por plantas o microorganismos (40).

En la atmósfera el nitrógeno molecular (N_2) constituye aproximadamente el 80% del volumen total pero resulta relativamente inerte desde el punto de vista químico y no puede ser utilizado por la mayor parte de los seres vivos (101) ya que estos necesitan obtener su nitrógeno de alguna forma combinada como nitratos, amonio o compuestos más complejos como aminoácidos (83, 101).

Debido a la necesidad de obtener nitrógeno y a las dificultades para utilizarlo, los microorganismos y las plantas han desarrollado una serie de estrategias para buscarlo y asimilarlo,

las cuales comprenden diferentes procesos como son la forma de buscarlo, incorporarlo a la célula, metabolizarlo para convertirlo a amonio, asimilarlo en glutamato y glutamina, distribuir el nitrógeno presente en estos aminoácidos, acumularlo en organelos específicos, sintetizar macromoléculas y finalmente degradar el nitrógeno celular para reciclarlo otra vez a amonio (101) ya que la utilización de cualquier compuesto nitrogenado conlleva siempre a su conversión a amonio (100).

En la naturaleza el nitrógeno sufre varias transformaciones que involucran a compuestos orgánicos, inorgánicos y volátiles, estas transformaciones pueden verse claramente en un ciclo, denominado ciclo del nitrógeno, en el cual este elemento es transformado por varios microorganismos del suelo (Fig. 1) (3).

El ciclo del nitrógeno ha sido muy estudiado debido a la importancia que tiene para la vida. El ciclo global consiste de varios procesos en secuencia en los que participan el medio ambiente y los seres vivos. Las etapas de que consta son las siguientes:

i) Amonificación y mineralización.

En el proceso de amonificación se forma amonio a partir de compuestos orgánicos ya que este es el producto final de la excreción animal y casi todo el nitrógeno inorgánico fluye a través de él. La mineralización es un proceso análogo a la liberación de CO₂ a partir de los materiales carbonados, que implica la conversión de nitrógeno orgánico al estado inorgánico con la consecuente

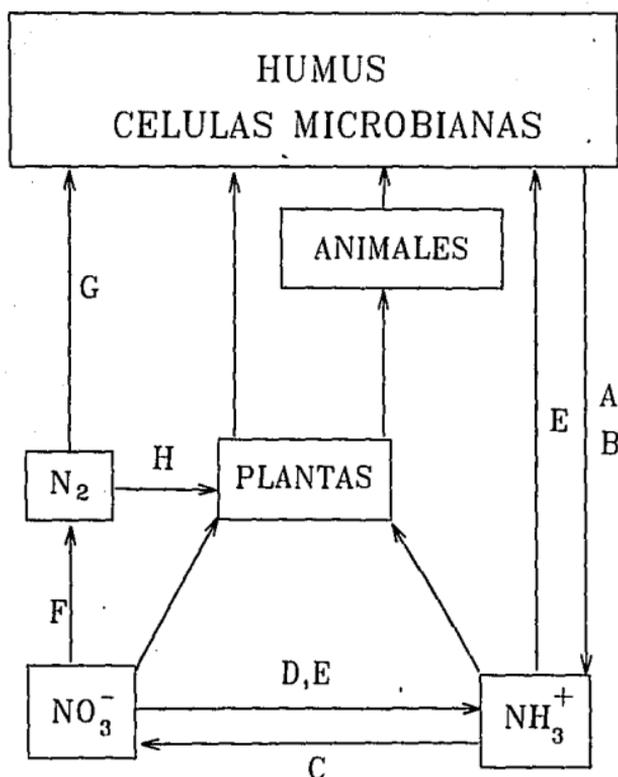


FIGURA 1.

CICLO DEL NITROGENO.

- | | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| A) Amonificación | E) Inmovilización |
| B) Mineralización | F) Desnitrificación |
| C) Nitrificación | G) Fijación de N_2 , no simbiótica |
| D) Reducción de nitrato | H) Fijación de N_2 , simbiótica |

producción de amonio y nitrato y desaparición de nitrógeno orgánico (3). La liberación de amonio puede ocurrir en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, la primera en el suelo y la segunda en sedimentos de océanos y lagos.

Aproximadamente un 50% del nitrógeno mineralizado se reincorpora en las células microbianas cuando el material que se ha descompuesto tiene una razón carbono/nitrógeno similar a la que está presente en ellas (58).

La mayoría de las moléculas que la célula puede sintetizar, también las puede catabolizar, ya que todas las biomoléculas están sujetas a un reciclaje celular. La falta de nitrógeno es una de las señales metabólicas más importantes para activar este reciclaje, es por esto que los microorganismos llegan a degradar ácidos nucleicos, nucleótidos, proteínas, aminoácidos, pared celular y aminoazucares en ausencia de nitrógeno.

El nitrógeno orgánico es mineralizado por las actividades de los organismos heterotróficos, principalmente bacterias amonificantes y hongos (90). La producción bacteriana atrae organismos que se alimentan de bacterias, entre los cuales prevalece Protozoa por su efectividad (55). Cuando la bacteria es consumida, parte del nitrógeno bacteriano es excretado como amonio y este puede ser tomado por las raíces de las plantas o ser transformado a nitrato por las bacterias (131).

ii) Inmovilización o asimilación.

La inmovilización es el resultado de la asimilación microbiana

de los nutrientes inorgánicos, es una consecuencia de la incorporación de amonio y nitrato a proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos de las células.

Cuando las proteínas de animales o cultivos entran en descomposición, liberan su nitrógeno en formas inorgánicas y una parte de este es reasimilado por las nuevas células que se generan en ese ambiente, así, siempre que sucede la mineralización se estimula la inmovilización. Es importante hacer una comparación entre la mineralización y la inmovilización en forma simultánea porque así se puede conocer el curso de las transformaciones del nitrógeno en un tiempo dado (3).

iii) Nitrificación.

El proceso de la oxidación biológica del amoníaco a nitritos y nitratos recibe el nombre de nitrificación y los microorganismos que participan en el se denominan nitrificantes (3). La nitrificación autotrófica es desarrollada por bacterias del tipo Gram negativas de la familia Nitrobacteriaceae, todos los organismos de esta familia son capaces de obtener sus requerimientos energéticos para su crecimiento de la oxidación de amonio a nitritos. Aunque ciertos organismos heterotróficos pueden producir nitrito o nitrato bajo condiciones de cultivo apropiadas, parece que no contribuyen significativamente a la nitrificación en ambientes naturales (8).

Las bacterias nitrificantes pueden dividirse en dos grupos principales: las que oxidan el amonio a nitrito y las que oxidan el

nitrito a nitrato. Las bacterias Nitrosomonas son consideradas la especie representativa que oxida amonio a nitrito. La serie subsecuente de reacciones que conducen a nitrato son desarrolladas principalmente en el medio por la bacteria autotrófica Nitrobacter (8).

iv) Desnitrificación.

En el proceso de desnitrificación se lleva a cabo una reducción del nitrato y del nitrito con la liberación de nitrógeno molecular y óxido nitroso, lo que trae consigo una pérdida neta del nitrógeno de los suelos.

El proceso de amonificación ocurre después de la muerte y descomposición de las plantas y animales y es llevado a cabo por microorganismos. El amonio producido de la descomposición orgánica, es oxidado a nitrato por bacterias llamadas nitrificantes el cual a su vez es tomado por las bacterias desnitrificantes como Pseudomonas, Micrococcus y Thiobacillus, que lo reducen a monóxido de nitrógeno (NO) y a nitrógeno molecular (N_2) liberándolo hasta que llega a formar parte de la atmósfera (3).

Los principales factores ambientales que afectan el proceso de desnitrificación son la cantidad y naturaleza de la materia orgánica, la aireación, la humedad, la acidez y la temperatura. Es por eso que las bacterias desnitrificantes son encontradas comúnmente en el abono, en el suelo fértil y en plantas de tratamiento de aguas residuales. Estas bacterias son aerobias pero en ambientes limitados de oxígeno o en condiciones anaerobias, usan

el nitrato como aceptor de electrones. La desnitrificación es esencialmente un mecanismo respiratorio en el que el nitrato sustituye al oxígeno molecular.

Se ha calculado que las pérdidas de nitrógeno debidas a la desnitrificación son compensadas por el nitrógeno atmosférico que es reducido a amonio por las bacterias llamadas fijadoras de nitrógeno (71).

v) Reducción. (Fijación).

La fijación de nitrógeno es el proceso por el cual el nitrógeno atmosférico se reduce a amonio. Este proceso es llevado a cabo biológicamente por bacterias en vida libre o en simbiosis aportando el 95% de la conversión de nitrógeno molecular a formas combinadas como amonio, el restante 5% es fijado como resultado de procesos abióticos a través del efecto de descargas eléctricas, luz ultravioleta, procesos industriales, etc. (27).

Dentro de los organismos capaces de realizar fijación biológica de nitrógeno, pueden distinguirse dos grandes grupos: uno de ellos está compuesto por microorganismos de los géneros Azotobacter, Anabaena, Klebsiella y Clostridium, por citar algunos, los cuales son capaces de fijar nitrógeno para llenar sus propios requerimientos, estos microorganismos fijan nitrógeno en vida libre, sin embargo, el gasto de energía para su crecimiento reduce la eficiencia de estas bacterias comparadas con las fijadoras simbióticas y contribuye solo con una quinta parte del nitrógeno fijado (27).

El otro grupo está formado por algunos microorganismos que pueden establecer relaciones mutualistas con las raíces de las plantas, principalmente leguminosas, y pueden fijar nitrógeno durante esta asociación. Dentro de los fijadores simbióticos de nitrógeno pueden citarse especies pertenecientes a los géneros Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium y Sinorhizobium. Desde el punto de vista ecológico, la fijación simbiótica de nitrógeno es la más importante porque el nitrógeno fijado es suministrado justo a la raíz de la planta, lo que garantiza su aprovechamiento, la desventaja es que representa una fuga energética en la fotosíntesis, lo cual se refleja en una menor relación tallo-raíz (143).

Con el proceso de la fijación biológica del nitrógeno se completa un ciclo y se da inicio a otro nuevamente (3).

En el ciclo del nitrógeno se puede observar que este elemento es muy susceptible a las transformaciones microbianas y al mismo tiempo tiene una posición crítica en la fertilidad del suelo, lo que se refleja en la producción y en la calidad de los cultivos agrícolas. Además, el nitrógeno es uno de los pocos nutrientes que se pierde tanto por volatilización como por lixiviación (111). Es por esto que es necesario procurar una conservación y suministro constante de las fuentes de nitrógeno.

Debido a la necesidad de aumentar las producciones agrícolas se ha recurrido al uso de fertilizantes químicos, los cuales son obtenidos en su mayoría a partir de una reacción con hidrógeno y el nitrógeno atmosférico, en donde el nitrógeno es reducido a amonio

mediante el proceso de Haber-Bosch. El hidrógeno necesario para este proceso es producido a partir de gas natural y para completar la reacción eficientemente hasta amonio se requiere de elevadas presiones y alta temperatura, lo que representa una gran demanda de energía (132).

El uso de los fertilizantes químicos puede ayudar a la agricultura, pero presenta varios inconvenientes tanto económicos como ecológicos (40, 41), como son: la necesidad de una industria sofisticada para su fabricación, el alto costo energético en el proceso de obtención, el elevado costo de transportación del producto, la contaminación del medio ambiente, ya que aproximadamente una tercera parte es lavado del suelo (97) al oxidarse a nitrato o perderse por desnitrificación, además de que solo una parte del nitrógeno agregado a los campos se recupera en el cultivo.

Otro problema que se presenta por el exceso en el uso de los fertilizantes, es que parte del nitrógeno es oxidado a nitratos y estos pueden contaminar los lagos, causando la eutroficación, provocando un crecimiento excesivo de las algas con la consecuente disminución del oxígeno y la muerte de los peces. Cuando las algas mueren y se descomponen, el agua adquiere olor y sabor desagradable. Además el nitrato es un compuesto potencialmente carcinogénico ya que puede convertirse a nitrito y reaccionar con aminas secundarias para dar nitrosaminas, que son compuestos que pueden inducir mutaciones. En los humanos la ingestión de aguas subterráneas contaminadas con nitrato provoca problemas de salud.

Debido a los inconvenientes que presenta el uso de los fertilizantes químicos y a que la fuente de nitrógeno más abundante se encuentra en la atmósfera, se ha pensado en la fijación simbiótica de nitrógeno como una alternativa biológica para fertilizar los suelos (87) con un menor costo y con menores problemas de contaminación.

La fijación simbiótica de nitrógeno se lleva a cabo principalmente entre plantas leguminosas y algunas bacterias. Las plantas de la familia Leguminosae se encuentran en diversas regiones que van desde las regiones tropicales hasta el ártico y comprenden desde pequeñas plantas anuales hasta grandes árboles. De las aproximadamente 13,000 especies de leguminosas que existen en el mundo, el hombre cultiva y consume aproximadamente 200, lo que representa un número de considerable importancia (3). El ejemplo clásico del proceso de fijación simbiótica de nitrógeno es el que sucede durante la relación entre las plantas leguminosas y las bacterias del género Rhizobium (14).

Los miembros del género Rhizobium son bacterias gram-negativas aerobias en forma de bacilos de 0.5 a 0.9 μm de ancho y de 1.2 a 3.0 μm de largo (3). El género se subdivide en dos clases de especies: los Rhizobium de crecimiento rápido que tienen un tiempo de duplicación de 2 a 4 horas y forman colonias de entre 2 y 4 mm de diámetro en 3 a 5 días y los Rhizobium de crecimiento lento que tienen un tiempo de generación de 6 a 8 horas y forman colonias de 1 mm después de 7 a 10 días de incubación (132).

El término rhizobia es aplicado a las bacterias del suelo de

los géneros Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium. Estas bacterias se han clasificado de diferentes formas, la primera clasificación llamada Grupo de Inoculación Cruzada (GIC), estaba basada en la especie de planta con que interaccionan ya que la simbiosis solamente puede darse por interacción con el simbionte específico, por ejemplo: Phaseolus vulgaris (frijol) es infectado por Rhizobium phaseoli y Rhizobium etli, Pisum sativum (chícharo) por Rhizobium leguminosarum, Glycine max (soya) por Bradyrhizobium japonicum y Sinorhizobium fredii, etc, aunque esta distinción no es absoluta, ya que se han descrito ejemplos de especificidades cruzadas (92). En los últimos años esta clasificación se ha modificado parcialmente debido a la gran información que se ha obtenido.

Esta nueva clasificación no solo se basa en la especificidad de las interacciones entre ambos simbiontes sino que también considera la velocidad de crecimiento, el metabolismo y la hibridización de DNA, comparando todas estas características mediante técnicas de taxonomía numérica (Tabla 1) (54, 91, 92, 132).

La especificidad de las interrelaciones entre los simbiontes rizobia-leguminosa implica algunos mecanismos de reconocimiento, uno de los cuales debe ser el intercambio de señales moleculares entre el hospedero y la bacteria (141), ya que durante la simbiosis ocurren cambios en sus procesos metabólicos como los que suceden durante el proceso de nodulación, en donde la bacteria sintetiza proteínas llamadas bacteriosinas y la planta sintetiza proteínas

TABLA 1.
CLASIFICACION DE LOS Rhizobia Y PREFERENCIA DE HOSPEDERO.

Género	Especie	Biovariedad	Hospedero
CRECIMIENTO RAPIDO			
Rhizobium	leguminosarum	phaseoli	Phaseolus
		trifoli viceae	Trifolium Pisum, Viceae Lens, Lathyus
	etli	Phaseolus	
	melliloti	Melilotus Medicago	
	loti	Loti Lupinus	
	fredi	Leucaena Medicago	
	tropici	Phaseolus Leucena, Siratro	
CRECIMIENTO LENTO			
Bradyrhizobium	japonicum		Lotus, Vigna Japonicum Mimosa Lupinus Leucena
Azorhizobium	caudinolans		Sesbania
Bradyrhizobium	spp		Parasponia

llamadas nodulinas (117), por lo que es necesario que se produzca la relación planta-bacteria específica para que se lleve a cabo el proceso de infección y la fijación simbiótica de nitrógeno.

La fijación de nitrógeno ocurre en una estructura nueva llamada nódulo que es desarrollada en una serie compleja de pasos. En el proceso de nodulación Rhizobium es quimotácticamente atraído hacia las raíces de la planta debido a atrayentes específicos (12, 28) que son excretados por la planta en la superficie de la raíz. Las células vegetales susceptibles de infección y de nodulación, se encuentran entre el pelo radicular más pequeño y el ápice de la raíz (15). Las bacterias inician la síntesis de un tetrasacárido acetilado alterando el crecimiento de los pelos de la raíz, de tal manera que provocan que crezcan deformes e incluso en espiral (35, 46, 109, 144), quedando atrapadas.

Mientras esto sucede, las células de la corteza de la raíz, bajo la epidermis, empiezan a dividirse (85, 104) y las bacterias atrapadas en la espiral de los pelos de la raíz o entre los pelos y otra célula, proliferan y empiezan a infectar a las células superficiales de la planta. Al mismo tiempo las células de la planta invadida son estimuladas a producir una envoltura de pared celular llamada "hilo de infección" (29) por donde penetran las bacterias al tiempo que se reproducen. Las células de la raíz van formando el cuerpo del nódulo al dividirse y los hilos de infección se ramifican; cuando las bacterias son liberadas en el citoplasma de las células de la raíz, son envueltas en la membrana plasmática de la planta llamada membrana peribacteroidal (115). En este punto

las bacterias dejan de crecer, se diferencian a bacteroides y empieza la fijación de nitrógeno y el intercambio metabólico (136, 142).

Durante el proceso de nodulación se expresan algunos genes que se han definido por mutagénesis con transposón, secuenciación y en algunos casos por análisis de proteínas. Estos genes se han denominado nod y están involucrados en las primeras etapas de interacción y morfogénesis del nódulo, produciendo la señal extracelular que elicitla la deformación de los pelos de la raíz y la formación del nódulo. Esta señal es un tetrasacárido de glucosamina acetilado y sulfatado que se ha denominado NodRm-1, y que además de provocar la deformación de los pelos de la raíz, induce la división cortical y la formación de nódulos a concentraciones nanomolares en cultivos asépticos de alfalfa (109). En su mayoría los genes nod se inducen cuando las bacterias entran en contacto con los exudados de las plantas o de extractos (34, 74, 76, 102, 121, 135, 145), estos exudados contienen compuestos flavonoides de diferentes tipos en las diferentes relaciones planta-huésped (82, 107, 108, 112).

Se han identificado varios tipos de genes nod (46, 112) por ejemplo, los genes huésped específico nodH y nodQ que hacen la señal de Rhizobium específica por la transferencia de un grupo sulfato, de manera que las mutantes en alguno de estos genes pueden infectar inespecíficamente y producen otra señal, NodRm-2, diferente a NodRm-1 por la ausencia del grupo sulfato (109).

Otros genes necesarios son los genes nodA, nodB y nodC que se

requieren para que la bacteria cause la división celular (50) y la deformación de los pelos de la raíz (9, 47, 80, 120) de tal manera que las mutantes afectadas en alguno de estos genes, no forman nódulos. Los genes nodABC pueden ser intercambiados funcionalmente entre todos los Rhizobium (46, 61, 80, 96). Existen otros genes llamados nodFE, nodG y nodLMN, responsables de la deformación de los pelos de la raíz, que no son conservados entre los diferentes Rhizobium debido a que no pueden sustituirse en las diferentes relaciones planta-huésped (36, 47, 80). Existe otro gene regulatorio llamado nodD que es constitutivo y por lo tanto se expresa en cultivos celulares que es el que activa a los demás genes nod en presencia del compuesto flavonoide inductor.

Cuando termina el proceso de nodulación comienza la fijación de nitrógeno como tal, de manera que la bacteria le proporciona a la planta nitrógeno en forma de amonio para sus requerimientos y esta le da a la bacteria un ambiente favorable y fotosintato, que es una fuente de energía para la función del bacteroide durante el proceso de fijación de nitrógeno (Figura 2).

La enzima responsable de fijar nitrógeno molecular a amonio es la nitrogenasa, esta enzima está formada por dos proteínas que no pueden fijar nitrógeno por separado, llamadas proteína Fe Mo y proteína Fe. El proceso requiere gran cantidad de energía para que cada molécula de N_2 sea convertida a dos moléculas de NH_3 , (26).



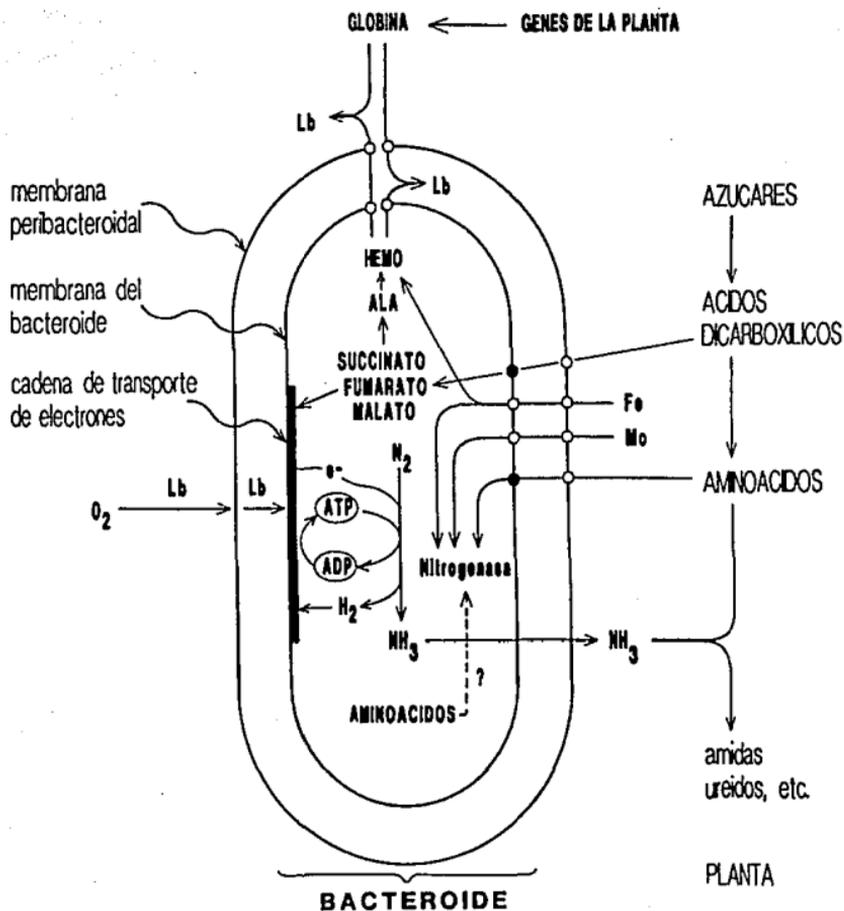


FIGURA 2.
INTERCAMBIO METABOLICO PLANTA-BACTERIA.

La proteína Fe Mo, es un tetrámero con dos pares de subunidades no idénticas (α , β) con un peso molecular aproximadamente entre 220,000 y 240,000. La proteína pequeña, proteína Fe, es un dímero de subunidades idénticas (α) con un peso molecular de entre 60,000 y 65,000 (64, 102). En la reacción que cataliza la nitrogenasa, el oxígeno se encuentra excluido ya que compete con la reducción del nitrógeno.

Para el proceso de fijación de nitrógeno son necesarios los genes de fijación, estos se han clasificado en dos grupos, los genes nif que tienen homología con los genes de fijación de nitrógeno de la enterobacteria Klebsiella pneumoniae, y los genes fix que no tienen homólogos en esa enterobacteria (87, 124).

El análisis genético de la fijación de nitrógeno fue iniciado en K. pneumoniae y es el sistema modelo en el que se ha basado el estudio de este proceso en otros microorganismos. En Klebsiella se ha encontrado que los genes nif están agrupados en un solo grupo (regulón) de 21 genes, cercanos al operón de biosíntesis de histidina, organizados en 8 operones regulados coordinadamente en respuesta a la condición nitrogenada de la célula (5, 49, 96, 98).

En Rhizobium algunos de los genes nif son estructural y/o funcionalmente equivalentes a los genes de fijación de nitrógeno de K. pneumoniae, como nifA, el operón nifHDK que codifica para las subunidades del complejo nitrogenasa y los genes nifB, nifE, nifN y nifS que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis del cofactor Fe Mo y su incorporación en la nitrogenasa (24, 25, 32, 37, 53, 70, 114, 122, 134, 137).

Otros genes que se requieren para la fijación de nitrógeno en Rhizobium, que no parecen ser equivalentes a los de Klebsiella, se han denominado genes fix. La mayoría de los genes nif y fix son controlados positivamente por el producto del gene nifA (1, 10, 24, 33, 49, 69, 74, 124, 134, 137, 139). En R. meliloti se ha demostrado que fixL y fixJ regulan a nifA en respuesta a la limitación de oxígeno (18). Los genes fixL y fixJ codifican para dos proteínas del tipo de proteínas regulatorias de dos componentes, en donde FixL es una hemoproteína que funciona como la proteína sensora de oxígeno, que es capaz de autofosforilarse y transferir el fosfato a la proteína activadora FixJ (66). Los genes fixL y fixJ controlan positivamente la transcripción de nifA y de fixK, cuyos productos activan la transcripción de los demás genes que participan en la fijación de nitrógeno (7, 18, 52).

Una vez que el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio, comienza el proceso conocido como asimilación de amonio, a través del cual se deriva todo el nitrógeno celular, y que consiste en la incorporación del nitrógeno inorgánico a esqueletos de carbono para formar los aminoácidos glutamato y glutamina, que a su vez son los donadores del nitrógeno necesario para la síntesis de todos los compuestos nitrogenados que la célula requiere (Fig. 3) (113).

Existen dos vías de asimilación de amonio: una que opera cuando las concentraciones de amonio son del orden de 1.0 mM (exceso de nitrógeno), en la que se incorpora directamente el amonio en glutamato, glutamina y asparagina y la otra vía que se lleva a cabo cuando las concentraciones de amonio son cercanas a

0.1 mM (condiciones de limitación de nitrógeno, como las existentes durante la fijación de nitrógeno) y en la que el amonio es asimilado solo en glutamina. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) respectivamente.

En condiciones de exceso de amonio opera la vía GDH, y en condiciones de limitación opera el sistema alternativo de reacciones acopladas GS-GOGAT.

En vida libre Rhizobium asimila el amonio en glutamina porque presenta una actividad de GDH muy baja o no detectable, de tal manera que el amonio es asimilado por la vía GS-GOGAT (4, 9).

En E. coli y otras bacterias existe solamente una glutamino sintetasa (GS) pero Rhizobium presenta dos GS denominadas GSI y GSII aunque recientemente en R. meliloti y R. leguminosarum se ha encontrado un locus llamado glnT, que no hibridiza con el gene que codifica para la GSI ni con el gene de la GSII, por lo que la enzima que codifica este locus se ha denominado GSIII (39, 57).

Se han clonado los genes glnA, que codifica para la GSI, y glnII, que codifica para GSII, de varias especies de Rhizobium y se han obtenido mutantes sencillas y dobles (30, 31, 39, 128). Los estudios realizados en mutantes sencillas de GS de B. japonicum muestran que son protótrofos de glutamina capaces de nodular y fijar nitrógeno; mientras que las dobles mutantes requieren glutamina para crecer, no pueden utilizar amonio como única fuente de nitrógeno, no nodulan, pero cuando se le adiciona glutamina al medio sí hay nodulación pero no fijación de nitrógeno (17, 31).

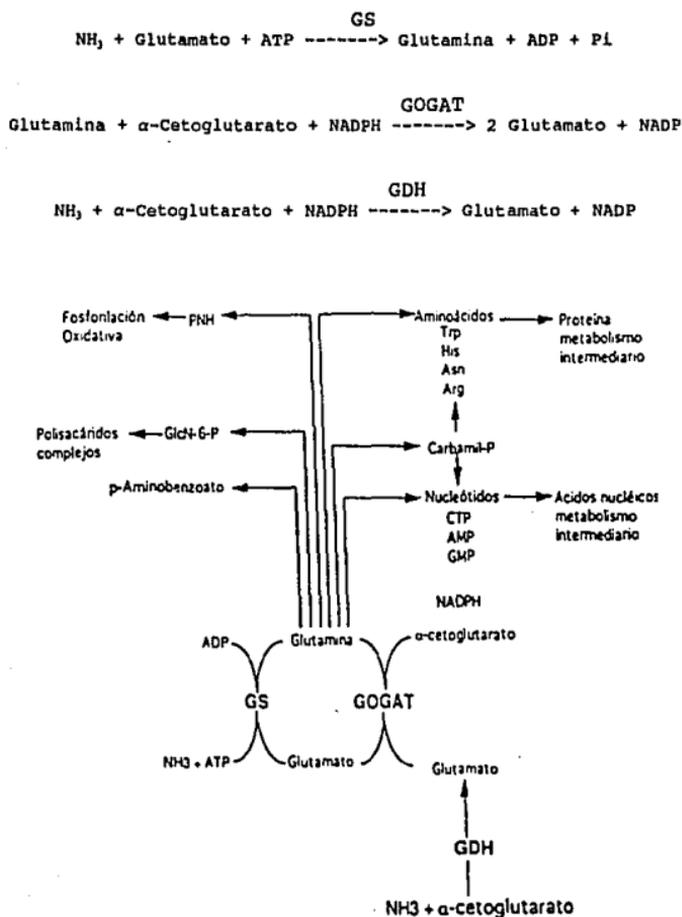


FIGURA 3.
SUBPRODUCTOS DEL GLUTAMATO Y DE LA GLUTAMINA.
VIAS EN QUE SON Y UTILIZADOS.

En R. meliloti las mutantes sencillas obtenidas en cada una de las 3 glutamino sintetetasas, son protótrofas de glutamina capaces de nodular y fijar nitrógeno, pero una doble mutante en glnA y glnII crece poco en medio mínimo amonio glutamato y es capaz de nodular y fijar nitrógeno (39, 128).

Estos resultados indican que las estrategias para intercambiar nitrógeno y carbono durante la simbiosis, son diferentes entre B. japonicum y R. meliloti. Recientemente se ha aislado una triple mutante de R. meliloti que no presenta actividad de ninguna de las glutamino sintetetasas, que es auxótrofa de glutamina y que nodula y fija nitrógeno, lo que sugiere que la GSIII es la responsable de la síntesis de glutamina en ausencia de la GSI y la GSII y que la diferencia de fenotipo simbiótico que existe entre las dobles mutantes es debida a que la planta de alfalfa es capaz de proveer de glutamina a R. meliloti mientras que la planta de soya no provee a B. japonicum de este aminoácido (106).

Durante la simbiosis ocurre un intercambio metabólico en el que la bacteria aporta el nitrógeno y la planta el carbono, y aunque se han hecho muchas hipótesis sobre la naturaleza de la fuente de carbono, lo cierto es que esta es y ha sido una de las mayores preguntas en la investigación en esta área porque la fuente de carbono limita la fijación de nitrógeno (73).

Se ha propuesto al ciclo de los ácidos tricarbóxicos como una vía central en el metabolismo de carbono en bacteroides (133) porque los niveles de las enzimas que participan en el se encuentran elevados (95) y porque las mutantes en la succinato

deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, forman nódulos inefectivos (51, 65), mientras que las mutantes afectadas en el metabolismo de carbohidratos forman nódulos efectivos (16, 67, 119, 133).

Los intermediarios del ciclo de Krebs, succinato, fumarato y malato son considerados como la fuente más probable de carbono y energía usada por los bacteroides debido a que las mutantes afectadas en el transporte de ácidos tricarbónicos no fijan nitrógeno (6, 23, 60, 75, 118, 119), aunque sí nodulan, lo que indica que existen otras fuentes de carbono que le proporciona la planta a la bacteria. Kahn et al. han propuesto a los compuestos carbonados que contienen nitrógeno como importantes fuentes de carbono y energía para los bacteroides (77, 78). Varios grupos de investigación han hecho estudios en B. japonicum y han demostrado que el aspartato y el glutamato pueden ser oxidados por los bacteroides y que a una concentración de 10 mM de glutamato se estimula la respiración y la fijación de nitrógeno (9, 123). Otros grupos han obtenido mutantes de R. meliloti que no crecen en glutamato como fuente de carbono y algunas de ellas presentan una actividad de nitrogenasa reducida (62). También se ha reportado que algunas mutantes incapaces de crecer en aspartato como fuente de carbono y que no tienen actividad de aspartato transaminasa, no pueden fijar nitrógeno, lo que indica que el aspartato sirve como un substrato esencial dentro del nódulo (56, 110).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos años ha aumentado el interés en el estudio del proceso de fijación simbiótica de nitrógeno debido a varias de sus características como son:

a) Ecológicamente el proceso resulta muy interesante ya que es una de las principales entradas al ciclo del nitrógeno y por lo tanto tiene influencia en el desarrollo global de este (131).

b) El hecho de que la fijación de nitrógeno en simbiosis representa una forma natural y no contaminante de satisfacer los requerimientos nitrogenados de algunos cultivos (130) presenta gran interés desde el punto de vista biotecnológico.

c) Es interesante conocer los mecanismos de adaptación que desarrollan los microorganismos simbióticos para sobrevivir en diferentes ambientes (2, 19, 88), así como los de prevalencia y competencia entre las diferentes cepas (48, 140).

d) Para que la relación simbiótica específica se lleve a cabo, se requiere de un intercambio de señales de reconocimiento entre la planta y el huésped que es especialmente interesante porque se trata de una relación entre organismos pertenecientes a dos reinos biológicos distintos (68, 72, 81, 84, 87, 92, 116).

e) En la fijación simbiótica de nitrógeno ocurren dos procesos de diferenciación durante la nodulación, uno sucede cuando se diferencian un grupo de células radiculares de la planta para producir el nódulo, y el otro cuando la bacteria se diferencia a bacteroide (103, 117).

f) Una vez que ha terminado el proceso de nodulación, comienza la fijación de nitrógeno y el intercambio metabólico entre la planta y la bacteria. Dentro de estos cambios metabólicos el bacteroide reduce el nitrógeno molecular a amonio y lo exporta a la planta para que lo asimile y esta dona fuentes de carbono al bacteroide para que este lo utilice como combustible (42).

Es por esto que en la actualidad muchos grupos de investigación se han concentrado en el estudio de la fijación biológica del nitrógeno. En nuestro país, así como en el resto del mundo, se pueden distinguir con claridad dos tendencias de investigación en el área, la primera es aislar bacterias simbióticas muy buenas fijadoras de nitrógeno de diferentes regiones para ser usadas como inoculantes. La segunda se ha enfocado en un conocimiento más detallado a nivel genético, bioquímico y molecular de los procesos simbióticos ya que estos podrían dar la pauta para ampliar el rango de simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas de interés agrícola que no pueden llevar a cabo dicho proceso. Incluso se ha planteado la posibilidad de manipular los genes responsables de la fijación de nitrógeno e introducirlos a diferentes plantas para que sean reconocidos como propios y se expresen de manera adecuada.

Como se ha mencionado, durante la simbiosis ocurre un intercambio metabólico en el que la bacteria aporta el nitrógeno y la planta el carbono y aunque se han hecho muchas hipótesis sobre la naturaleza de la fuente de carbono, todavía no se puede decir con certeza cual o cuales son las más importantes o las requeridas

por el bacteroide. Esto es muy importante debido a que el abastecimiento de la fuente de carbono limita la fijación de nitrógeno (73).

Otro aspecto interesante es el hecho de que se haya propuesto a los compuestos carbonados que contienen nitrógeno como importantes fuentes de carbono y energía para los bacteroides, así como el hecho de que se haya demostrado en B. japonicum que el aspartato y el glutamato pueden ser oxidados por los bacteroides y que cierta concentración de glutamato estimula la respiración y la fijación de nitrógeno. También es importante el hecho de que las mutantes de R. meliloti incapaces de crecer en glutamato como fuente de carbono presenten una actividad de nitrogenasa reducida.

Con base en estos fundamentos, se han obtenido mutantes de Rhizobium etli alteradas en el catabolismo de glutamato, la nodulación y la fijación de nitrógeno, debido a que existen varias evidencias que sugieren que los aminoácidos pueden tener un papel importante en la relación simbiótica Rhizobium - leguminosa.

OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es la clonación del locus que complementa a una de las mutantes de R. etli alteradas a el catabolismo de glutamato, la nodulación y la fijación de nitrógeno.

Algunas de las mutantes obtenidas se han caracterizado fisiológicamente obteniendo resultados interesantes que pueden analizarse más a fondo si conocemos la naturaleza del gene afectado por la inserción del transposón.

Para lograr el objetivo principal se proponen los siguientes objetivos particulares:

- 1) Determinar el efecto de las mutaciones de las bacterias durante la simbiosis Rhizobium - leguminosa.
- 2) Elegir la mutante que presente un efecto más definido y un fenotipo más estable para continuar el trabajo con una sola mutante.
- 3) Determinar la presencia y localización del transposón en la mutante elegida.
- 4) Complementar la mutante elegida con un banco de genes de R. etli.
- 5) Extraer el plásmido que complementó a la mutante de Rhizobium.
- 6) Transformar a E. coli con el plásmido obtenido de la complementación de la mutante.
- 7) Purificar el DNA genómico de la mutante y de la cepa

silvestre y el DNA de los plásmidos introducidos a E. coli, obtenidos de la complementación de la mutante y del plásmido que contiene al Tn5.

8) Determinar el patrón de restricción de los plásmidos obtenidos de la complementación de la mutante.

9) Hibridizar DNA de los plásmidos que complementaron a la mutante, contra DNA total de la mutante y de la cepa silvestre para determinar la localización de la región clonada.

10) Introducir nuevamente los plásmidos a la mutante para asegurar que no haya reversiones.

MATERIAL Y METODOS.

CEPAS.

Las cepas de R. phaseoli utilizadas en este trabajo son: la cepa silvestre CE3 con resistencia al ácido nalidíxico y a estreptomycin, (105) recientemente reclasificada y llamada R. etli (125); y las cepas mutantes LM01, LM11 y LM13 con resistencia al ácido nalidíxico y a kanamicina (no publicado), obtenidas en el laboratorio del Dr. Calderón por mutagénesis con el transposón Tn5-mob, seleccionadas por su incapacidad para crecer en glutamina como fuente de carbono y nitrógeno.

Los plásmidos utilizados en este trabajo son: el plásmido PRK2013 (79, 45, 59) con resistencia a tetraciclina; la cepa Sm17 que lleva el plásmido pSUP 202 con el inserto Tn5-mob (126), con resistencia a kanamicina; el banco de genes de R. phaseoli (Calderón no publicado) en el vector pLAF R1 (43, 44, 63) con resistencia a tetraciclina.

La cepa de E. coli es la HB101 (20).

MEDIOS DE CULTIVO.

Py

El medio rico para crecer las cepas de R. phaseoli es Py (Peptone-Yeast) (13), y está compuesto de:

Peptona de caseína	0.5 %
Extracto de levadura	0.3 %
CaCl ₂	7.0 Mm
Agar (solo para medio sólido)	1.5 %

Para el medio sólido se agrega la cantidad necesaria de agar al matraz, se esteriliza en autoclave. El pH del medio es de 6.8 aproximadamente .

La solución de cloruro de calcio se prepara por separado a una concentración 100 X y se esteriliza en autoclave, se agrega hasta que el medio de cultivo está tibio.

LB

El medio rico para crecer E. coli es LB (Luria-Bertani Broth) (99) y está compuesto de:

Peptona de caseína	1.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	1.0 %
Agar (solo para medio sólido)	1.5 %

Para el medio sólido se agrega la cantidad indicada de agar a cada matraz, se esteriliza en autoclave. El Ph del medio es de 7.0.

MM

El medio mínimo usado para crecer R. phaseoli es MM y está compuesto de (91):

K_2HPO_4	1.2 Mm
$MgSO_4$	0.8 Mm
Acido succínico	10.0 Mm
Fuente de nitrógeno	10.0 Mm
$CaCl_2$	1.5 Mm
$FeCl_3$	0.0005%

El ácido succínico es la fuente de carbono, pero se pueden usar otros compuestos como glucosa, glicerol, etc.

La fuente de nitrógeno puede ser cualquier aminoácido, si es estable a alta temperatura puede agregarse al medio antes de esterilizar y si no, se esteriliza por filtración y se agrega al medio cuando está tibio.

El cloruro de calcio se prepara a una concentración 100 X y se esteriliza en autoclave por separado, se agrega al medio antes de usarse.

El $FeCl_3$ se prepara a una concentración 1000 X y se esteriliza por filtración, se agrega al medio antes de usarse.

Para medio sólido se agrega 1.5 % de agar al matraz antes de esterilizar.

Este medio se puede preparar a partir de soluciones

concentradas 100 X a pH 6.8 de los tres primeros compuestos.

ANTIBIOTICOS

Los antibióticos a los cuales presentan resistencia las diferentes cepas son:

ANTIBIOTICO	SIMBOLO	CONCENTRACION µg/ml
Acido nalidíxico	Nal	20
Kanamicina	Kn	30
Estreptomicina	Sm	250
Tetraciclina	Tc	10

Los antibióticos se agregan al medio líquido antes de usarse y al medio sólido cuando está tibio, alrededor de 45-50°C, antes de llenar las cajas Petri.

CURVAS DE CRECIMIENTO.

Para determinar las cinéticas de crecimiento de la cepa silvestre y de la mutante en diferentes medios, es necesario cuantificar el aumento en el número de células y en la cantidad de proteína en el cultivo con respecto al tiempo. El procedimiento es el siguiente:

- Sembrar cajas de las cepas de Rhizobium en medio rico (Py) con los antibióticos indicados. Incubar las cajas invertidas a 29°C por 2 a 3 días.

- Sembrar 100 ml de medio líquido Py y los antibióticos indicados, contenidos en un matraz con capacidad de 250 ml, con una buena cantidad de la cepa fresca.

- Incubar los matraces en una incubadora con agitación a 29°C y 200 rpm por 16-18 horas, para que el cultivo alcance la saturación.

- Centrifugar los 100 ml del cultivo a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos.

- Decantar, lavar la pastilla celular con 50 ml de solución estéril de sales para medio mínimo, resuspendiendo totalmente.

- Centrifugar a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos.

- Decantar con cuidado porque la pastilla celular ya no queda tan compacta.

- Resuspender en 6 ml de una solución estéril de sales para medio mínimo.

- Diluir 200 veces, tomar 50 µl de esta suspensión y llevarlos a 1 ml, tomar 100 µl de esta dilución y llevarlos a 1 ml. Leer en el espectrofotómetro a 540 nm contra un blanco de agua.

- Hacer los cálculos para sembrar 100 ml de medio a 0.05 de densidad óptica. Usar la siguiente fórmula:

$$V_2 = \frac{V_1 \times D.O._1}{D.O._2}$$

V_1 = Volumen que se desea sembrar (100 ml).

$D.O._1$ = Densidad óptica a la que se sembrará (0.05).

$D.O._2$ = Densidad óptica del concentrado de células, multiplicada por la dilución que se haya hecho.

V_2 = Volumen del concentrado de células necesario para sembrar el volumen indicado a la D.O. inicial indicada.

- Sembrar los medios de cultivo en los que se quiere determinar el crecimiento y el medio rico como control. Agitar ligeramente para homogeneizar.

- Tomar 1 ml de muestra de cada matraz para leer D.O. en el espectrofotómetro a 540 nm contra un blanco de agua, y 1 ml para determinación de proteína, este punto se considera tiempo cero.

- Incubar a 29°C y 200 rpm.

- Tomar 1 ml de muestra para leer D.O. y otro para determinar proteína a los tiempos 4, 8, 12 y 24 horas.

- Leer en el espectrofotómetro a 540 nm el mililitro para densidad óptica contra un blanco de agua.

- Centrifugar 2 minutos el mililitro de muestra para determinar proteína, decantar lo más posible cuidando de no perder pastilla, agregar 500 μ l de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %.

- Hacer la determinación de proteína por el método de Lowry una vez que se tienen todas las muestras de las 24 horas.

- Graficar los datos de densidad óptica contra tiempo en papel semilogarítmico de 3 ciclos.

- Graficar los datos de proteína contra tiempo en papel semilogarítmico de 3 ciclos.

DETERMINACION DE PROTEINA.

La determinación de proteína se hace por el método de Lowry (89) modificado para volúmenes pequeños. El procedimiento es el siguiente:

- Preparar las soluciones A, B y C con anticipación.

Solución A

NaOH	0.1 N
Na ₂ CO ₃ -2H ₂ O	2.0 ‰

Almacenar a temperatura ambiente en frasco ámbar.

Solución B

Tartrato de sodio y potasio.

KNaC ₄ H ₄ O ₆ -4H ₂ O	2.0 ‰
--	-------

Almacenar a 4°C.

Solución C

CuSO ₄ -5H ₂ O	1.0 ‰
--------------------------------------	-------

Almacenar a 4°C.

- Preparar con anticipación una solución de albúmina para usarla como standard.

Proteína standard

Albúmina sérica bovina	400 µg/ml
------------------------	-----------

Alicuotar y almacenar a -20°C.

- Tomar las muestras a las que previamente se les agregó TCA y centrifugarlas 5 minutos en microcentrífuga.

- Aspirar el sobrenadante con una jeringa para dejar la pastilla celular lo más seca posible.

- Resuspender la pastilla celular en una solución de NaOH 0.4 M, en un volumen de 100 o 200 µl de sosa según el tamaño de la pastilla.

- Preparar la solución ABC, a partir de las soluciones previamente preparadas, de la siguiente forma: poner en un matraz 98 ml de solución A, agitar ligeramente y agregar de inmediato 1 ml de solución B, agitar bien y agregar 1 ml de solución C. Mezclar siempre en ese orden para evitar precipitaciones.

- Preparar la solución de Folin mezclando una parte de Folin-Ciocalteu con 2 partes de agua.

- Hacer la siguiente reacción en un tubo de ensayo de 13x100:

160 μ l de agua
40 μ l de muestra
1000 μ l de solución ABC

- Preparar un standard al mismo tiempo:

100 μ l de agua
100 μ l de albúmina
1000 μ l de solución ABC

- Preparar también un blanco:

200 μ l de agua
1000 μ l de solución ABC

- Agitar y reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

- Agregar 100 μ l de solución de Folin.

- Agitar y reposar 30 minutos a temperatura ambiente.

- Leer a 625 nm contra el blanco.

- Calcular el factor con la siguiente fórmula:

Conc. albúmina X Vol. NaOH

F= -----

D.O. standard X Vol. sol. ABC X alícuota

Concentración de albúmina en la reacción = 40 μ g/ml

Volumen de sosa = 100 o 200 μ l

D.O. standard = lectura del
standard.

Volumen de solución ABC = 1 ml

Alicuota de muestra tomada = 40 μ l

- Calcular la proteína multiplicando el factor obtenido por la lectura de cada muestra. El resultado se obtiene en microgramos por mililitro (μ g/ml).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA.

Para la determinación de la actividad enzimática de GDH se hicieron varias modificaciones en los volúmenes de los reactivos usados en las reacciones con respecto al método reportado (22), el procedimiento es el siguiente:

- Sembrar un cultivo de las cepas frescas en 100 ml de medio rico con antibiótico.

- Incubar 16-18 horas a 29°C 200 rpm.

- Hacer el cultivo de las cepas en medio mínimo como se describe en el procedimiento de curvas de crecimiento.

- Incubar solamente durante 4 horas a 29°C 200 rpm.

- Centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm y 4°C.

- Decantar, lavar la pastilla celular con 30-100 ml de sales de medio mínimo.

- Centrifugar a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos.

- Decantar con cuidado para no perder pastilla celular.

- Resuspender la pastilla celular en 2 ml de solución amortiguadora de extracción.

- Poner la muestra a un tubo de plástico de 16 X 100 cortado a una tercera parte y ponerlo en hielo.

- Sonicar la muestra en el sonicador por 3 minutos a 15 micrones de amplitud manteniendo en hielo el tubo con la muestra.

- Transferir el extracto a tubos eppendorf, centrifugar en microcentrífuga por 3 minutos a 4°C.

- Recuperar el sobrenadante, ponerlo en un tubo eppendorf y conservarlo en hielo.

- Conservar un poco del extracto para la determinación de proteína.

- Determinar GDH biosintética haciendo las siguientes reacciones:

DETERMINACION DE GDH BIOSINTETICA

Reactivos	Reacción Completa	Control -NH ₄ Cl	Control -actg	Control -Antimic.	Control -Extrac.
Sol.amort.ens.	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
NH ₄ Cl	200 µl	-----	200 µl	200 µl	200 µl
NADH	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
H ₂ O	-----	200 µl	100 µl	300 µl	200 µl
Extracto	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	-----
Antimicina	200 µl	200 µl	200 µl	-----	200 µl
α-cetoglut.	100 µl	100 µl	-----	100 µl	100 µl

- Hacer la determinación enzimática de GDH biosintética de la siguiente forma: en las celdas del espectrofotómetro preparar la reacción completa y de cada control, partiendo de cocteles, ajustar

el cero con el control sin NADH, agregar el α -cetoglutarato a las reacciones que lo llevan, mezclar y leer en el espectrofotómetro a 340 nm por 15 minutos, leer y graficar cada dos minutos cada reacción.

- Para determinar GDH catabólica se hacen las siguientes reacciones:

DETERMINACION GDH CATABOLICA

Reactivos	Reacción Completa	Control -glutamato	Control -extracto
Sol.amort.ens.	200 μ l	200 μ l	200 μ l
NAD(o NADP)	200 μ l	200 μ l	200 μ l
H ₂ O aforar	-----	200 μ l	200 μ l
Antimicina A	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Extracto	200 μ l	200 μ l	-----
Glutamato	200 μ l	-----	200 μ l

- Determinar la actividad enzimática de GDH catabólica de la siguiente forma: preparar la reacción completa y de cada control en las celdas del espectrofotómetro, partiendo de cocteles; ajustar el cero con el control sin extracto, agregar el extracto a las reacciones que lo llevan, mezclar y preincubar por 10 minutos a temperatura ambiente, agregar el glutamato para iniciar la reacción y leer en el espectrofotómetro a 340 nm por 15 minutos, leyendo y graficando cada dos minutos cada reacción.

- Preparar los reactivos necesarios para las determinaciones de GDH de preferencia el mismo día, preparar las soluciones amortiguadoras con anticipación y únicamente agregar el β -

mercaptoetanol el mismo día a la solución amortiguadora que lo lleva.

REACTIVOS PARA LA DETERMINACION ENZIMATICA DE GDH.

1) Solución amortiguadora de extracción.

Tris HCl 50 mM

Ajustar el pH a 7.6

β -mercaptoetanol 10 mM

2) Solución amortiguadora de reacción.

Tris HCl 250 mM

Ajustar el pH a 7.6

3) NADH.

NADH 2.5 mM

4) NADPH.

NADPH 2.5 mM

5) Antimicina A.

Antimicina A 0.24 mM

Etanol al 80 % c.b.p.

6) L-glutamato.

L-glutamato 250 mM

Ajustar el pH a 7.0

7) NH_4Cl .

NH_4Cl 200 mM

8) α -cetogluturato.

α -cetogluturato 200 mM

Ajustar el pH a 7.6

- Graficar los datos de actividades enzimáticas contra tiempo.

- Hacer las determinaciones de proteína por el método de

Lowry.

- Calcular la actividad de GDH. Las actividades de la GDH biosintética y catabólica se calculan igual.

Cálculos:

$$\begin{array}{rcl} 0.1 \mu\text{mol} & \text{-----} & 0.62 \text{ D.O.} \\ X & \text{-----} & \Delta \text{ D.O.} \end{array}$$

$$X = \mu\text{mol}/\Delta T$$

$$X \mu\text{mol} + \Delta T = Y \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$Y \mu\text{mol}/\text{min} + \text{Proteína en } 200 \mu\text{l} = \text{Actividad enzimática en } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgP.}$$

Datos necesarios:

$$1 \mu\text{mol de NADH} = 0.62 \text{ D.O.}$$

$$\Delta \text{ D.O.} = \text{Lectura de D.O del punto lineal elegido de la gráfica menos lectura del punto inicial.}$$

$$\Delta T = \text{Tiempo del punto lineal elegido de la gráfica menos tiempo del punto inicial.}$$

- Calcular la actividad específica restando la actividad en la reacción completa, a la actividad en la reacción sin α -cetoglutarato para la GDH biosintética y la actividad en la reacción completa menos la actividad de la reacción sin glutamato para la GDH catabólica.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALANINO DESHIDROGENASA.

El procedimiento para la determinación de la actividad de alanino deshidrogenasa (ADH) biosintética y catabólica, es el mismo

que para la actividad enzimática de la glutamato deshidrogenasa, la única diferencia es que en las reacciones enzimáticas se usa ácido pirúvico en lugar de α -cetoglutarato en la determinación de ADH biosintética y alanina en vez de glutamato en la determinación de ADH catabólica.

Los cálculos de la actividad enzimática de ADH son iguales que los de la determinación de la actividad de GDH.

REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALANINO DESHIDROGENASA.

1) Acido pirúvico.

Acido pirúvico	200 mM
Ajustar el pH a 7.6	

2) Alanina.

Alanina	250 mM
---------	--------

CONJUGACION.

En este procedimiento se requiere de una cepa donadora (generalmente una cepa de *E. coli* que contiene el plásmido de interés), una cepa receptora (en este caso cepas de *R. phaseoli*) y un plásmido ayudador (pRK2073), para que se lleve a cabo la conjugación (41). El procedimiento es el siguiente:

- Tomar con el aza una gran cantidad de células de una caja con la cepa fresca, resuspender cada cepa por separado en un tubo eppendorf estéril con 500 μ l de agua.

- Centrifugar 2 minutos en microcentrífuga a temperatura ambiente. Decantar.

- Resuspender en el volumen de agua estéril necesario para que

todas las cepas tengan la misma concentración aproximadamente.

- Mezclar, en un tubo eppendorf estéril, volúmenes iguales de la suspensión de células de las 3 cepas y hacer un control sin plásmido ayudador.

- Centrifugar 2 minutos en microcentrífuga a temperatura ambiente. Decantar.

- Resuspender la pastilla celular en el pequeño volumen que queda en el tubo al decantar.

- Tomar el concentrado de células y ponerlo en una caja de Petri con medio rico, esperar a que seque, incubar toda la noche a 29°C.

- Tomar con un aza una buena cantidad de la cruz y estriar para aislar colonias en cajas Petri con medio rico con los antibióticos a los cuales presenta resistencia la cepa receptora y el plásmido introducido, en medio rico con antibióticos para la cepa donadora y en un medio selectivo si se requiere.

- Tomar varias colonias aisladas y probar su fenotipo en diferentes medios.

- Extraer DNA de plásmido para comprobar que se encuentre en la cepa receptora.

EXTRACCION DE DNA DE PLASMIDO.

Se utilizó el método de lisis alcalina (91). El procedimiento es el siguiente:

- Con la cepa fresca que contenga el plásmido, sembrar 5 ml de medio rico con los antibióticos a los cuales presenta resistencia

la cepa en cuestión, especialmente a los que confiere resistencia el plásmido.

- Incubar con agitación de 12 a 18 horas (hasta que el cultivo alcance la saturación) a la temperatura de crecimiento del microorganismo.

- Centrifugar en microcentrífuga a temperatura ambiente, 1.5 ml del cultivo, para plásmidos de alto número de copias, y 5 ml del cultivo para plásmidos de bajo número de copias.

- Retirar el sobrenadante por aspiración para dejar la pastilla celular lo más seca posible.

- Resuspender la pastilla celular en 100 μ l de una solución fría y recién preparada de: Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8 y 4 mg/ml de lisozima.

- Reposar 5 minutos a temperatura ambiente.

- Agregar 200 μ l de una solución fría y recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS 1 %. Agitar invirtiendo el tubo rápidamente 2 o 3 veces.

- Reposar en hielo 5 minutos.

- Agregar 150 μ l de una solución fría de acetato de potasio. Agitar en vortex 2 segundos.

- Reposar 5 minutos en hielo.

- Centrifugar 10 minutos a temperatura ambiente.

- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio cuidando de no llevar debris celular.

- Agregar 1 volumen de una solución de fenol - cloroformo - alcohol isoamílico (25/24/1), agitar en vortex.

desaparezcan las burbujas. No debe esterilizarse en autoclave.

3) Solución NaOH 0.2 N y SDS 1%.

Esta solución también puede prepararse a partir de soluciones concentradas. La solución de NaOH debe prepararse máximo una semana antes de usarse.

SOLUCIONES CONCENTRADAS.

a) NaOH	10 N
b) SDS	20 %

4) Solución de acetato de potasio.

Se preparan 60 ml de acetato de potasio 5 M, se agregan 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua. La solución resultante es de 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato y tiene un pH aproximado de 4.8.

5) Fenol saturado.

El fenol se licúa a 68-70°C, se pone en un destilador y se calienta aproximadamente a 160°C, se eliminan las cabezas y colas de la destilación. El fenol destilado se pone en frascos ámbar y se guarda a -20°C.

Para saturar el fenol se requiere que esté líquido, se le agrega tris 1 M pH 8 1:1 v/v y se agita con un agitador magnético en frío durante 24 horas haciendo varios cambios de tris durante el día. Se deja que se separen las dos fases y se retira la fase acuosa. Se agrega tris 0.1 M pH 8 y se agita por 1-2 horas más. Se retira la mayor cantidad de fase acuosa y el fenol se guarda en alícuotas a -20°C.

6) Fenol - cloroformo - alcohol isoamílico (25/24/1).

Se mezclan 25 ml de fenol saturado, 24 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico, se almacena en frasco ámbar a 4°C.

7) Solución tris 10 mM-EDTA 1mM pH 8 (T.E. 10-1).

Esta solución se prepara a partir de soluciones concentradas que se han ajustado a pH 8.

SOLUCIONES CONCENTRADAS

Tris	2.0 M
EDTA	0.5 M

8) RNAasa 10 mg/ml.

RNAasa	30 mg
Tris 2 M pH 7.5	15 μ l
H ₂ O	2.985 ml

Se mezcla todo y se hierve a baño Ma. por 10 minutos. Se deja enfriar y se almacena en alícuotas a -20°C.

GEL DE AGAROSA.

Los geles de agarosa (91) se usan para estimar la cantidad y pureza del DNA extraído en cualquiera de los métodos descritos, así como para observar los patrones de restricción de DNA digerido con enzimas de restricción y transferirlo a filtros de nitrocelulosa en caso necesario. El procedimiento en general es el siguiente:

- Determinar la concentración de agarosa necesaria para obtener la mejor resolución de los fragmentos que se deseen separar (por lo general se prepara al 1%).

- Disolver la agarosa en la solución amortiguadora TBE 1X calentando en horno de microondas o en mechero.

- Agregar 10 μ l de una solución concentrada de bromuro de etidio por cada 100 ml de agarosa.

- Enfriar por lo menos a 55°C antes de preparar el gel para que no se deformen las charolas para los geles horizontales o no se rompan los vidrios para los geles verticales.

- Rápidamente introducir en la agarosa tibia el peine del tamaño elegido.

- Esperar a que el gel esté sólido y retirar el peine.

- Poner el gel dentro de la cámara de electroforesis con

solución amortiguadora 1 X.

- Agregar a las muestras la mezcla de parar.

- Poner el marcador de peso y las muestras dentro de cada pozo del gel.

- Conectar los cables de la cámara de electroforesis a la fuente de poder.

- Correr el gel a 100 volts a temperatura ambiente hasta 1.5 cm antes de la orilla inferior.

- Observar el gel con luz ultravioleta.

SOLUCIONES NECESARIAS PARA LA ELECTROFORESIS.

GEL DE AGAROSA.

Agarosa	1 %
B.T.B.E.1 X	c.b.p.

SOLUCION AMORTIGUADORA TRIS BORATOS 10 X (B.T.B.E. 10X).

	1000.0 ml
Tris base	54.0 g
Acido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M pH 8	20.0 ml

La solución amortiguadora 1 X se prepara a partir de la solución amortiguadora concentrada.

MEZCLA DE PARAR (STOP MIX).

Azul de bromofenol	0.25 %
Xilene cianol	0.25 %
Ficoll tipo 400	15.00 %

Esta mezcla da consistencia al DNA y lo mantiene en el fondo del pozo del gel, a su vez permite observar el recorrido del DNA.

SOLUCION CONCENTRADA DE BROMURO DE ETIDIO.

Bromuro de etidio 10 mg/ml

EXTRACCION DE DNA TOTAL.

Esta técnica se usa para extraer DNA total de E. coli y de Rhizobium y puede usarse para algunas otras bacterias (91), el procedimiento ligeramente modificado es el siguiente:

- A partir de la cepa crecida recientemente en caja Petri, sembrar con una azada de células 5 ml de medio rico con los antibióticos a los cuales presenta resistencia.

- Incubar entre 12 y 24 horas (hasta que el cultivo alcance la saturación) con agitación y a la temperatura de crecimiento del microorganismo.

- Centrifugar en microcentrífuga los 5 ml de cultivo.

- Aspirar el sobrenadante para dejar la pastilla celular lo más seca posible.

- Resuspender la pastilla celular en 1 ml de T.E. 50-20 pH 8, para lavar.

- Centrifugar 2 minutos en microcentrífuga a temperatura ambiente.

- Resuspender la pastilla celular en 482 μ l de T.E. 50-20 pH 8, 15 μ l de SDS 20 % y 3 μ l de proteinasa K con una concentración de 20 mg/ml. Mezclar por inversión.

- Incubar 1 hora a 37°C.

- Romper las células succionando 3 o 4 veces con una jeringa

de 1 ml.

- Extraer 2 veces con un volumen igual de una solución de fenol - cloroformo - alcohol isoamílico. Agitar hasta obtener una emulsión.

- Centrifugar 2 minutos a temperatura ambiente.

- Recuperar la fase acuosa, fase superior.

- Extraer 2 veces con un volumen igual de una solución de cloroformo - alcohol isoamílico.

- Centrifugar 5 minutos.

- Recuperar la fase acuosa, fase superior.

- Precipitar con dos volúmenes de etanol absoluto, mezclar por inversión y reposar por 2 horas a -20°C .

- Centrifugar 15 minutos a 4°C .

- Lavar el DNA con $600\ \mu\text{l}$ de etanol al 70 %.

- Centrifugar 5 minutos.

- Decantar con cuidado y secar el DNA con vacío.

- Resuspender en $100\ \mu\text{l}$ de solución T.E. 10-1 pH 8.

- Adicionar $2\ \mu\text{l}$ de RNAasa (solución concentrada $10\ \text{mg/ml}$).

- En preparaciones de este tipo se obtienen aproximadamente $130\ \mu\text{g}$ de DNA.

SOLUCIONES NECESARIAS PARA LA EXTRACCION DE DNA TOTAL.

1) Solución tris 50 mM EDTA 20 mM pH 8 (T.E. 50-20).

Esta solución se prepara a partir de soluciones concentradas de pH 8.

SOLUCIONES CONCENTRADAS

Tris HCl	2.0 M
EDTA	0.5 M

2) Dodecil sulfato de sodio (SDS) 20 %.

SDS	20 %
T.E. 50-20	c.b.p.

3) Proteínasa K 20 mg/ml.

Proteínasa K	20 mg/ml
T.E. 50-20	c.b.p.

Predigerir a 37°C por 1 hora. Almacenar en alícuotas a -20°C.

4) Fenol - cloroformo - alcohol isoamílico (25/24/1).

Descrito en el procedimiento de la extracción de DNA de plásmido.

5) Solución tris 10 mM EDTA 1 mM pH 8 (T.E. 10-1).

Descrito en el procedimiento de la extracción de DNA de plásmido.

6) RNAasa 10 mg/ml.

Descrito en el procedimiento de la extracción de DNA de plásmido.

DIGESTION DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCION.

La digestión de DNA se lleva a cabo por las enzimas de restricción cuando reconocen la secuencia de bases específica en donde pueden cortar el DNA, produciendo fragmentos de diferentes pesos. Estas enzimas se conocen como endonucleasas, cada una tiene características definidas reconociendo sitios específicos y reciben su nombre por el microorganismo del cual se extraen (91).

Las enzimas usadas en este trabajo son:

EcoR1. Aislada de Escherichia coli RY13, la secuencia que

reconoce es:

5' - G|AATT C - 3'

3' - C T|TAA↑G - 5'

BamH1. Aislada de Bacillus amyloliquefaciens H, la secuencia que reconoce es:

5' - G|GATC C - 3'

3' - C C|TAG↑G - 5'

La concentración de las enzimas se expresa en unidades por mililitro, en donde una unidad es la cantidad de enzima que digiere un microgramo de DNA en una hora. Comercialmente las enzimas son vendidas por unidades y en el envase se indica el contenido en unidades por volumen.

Estas enzimas requieren de una solución amortiguadora específica en la reacción que generalmente viene incluida comercialmente con cada enzima a una concentración de 10 X (Sol. 10 X).

Reacción de digestión:

DNA	1 µg
Sol. 10 X	1/10 del volumen total
Enzima	1 unidad/µg de DNA
H ₂ O	Para aforar al menor volumen posible

Hecha la mezcla se agita para homogeneizar y se incuba a la temperatura de reacción óptima de cada enzima por lo menos por una

hora.

Al término de la reacción se hace un gel de agarosa para checar el grado de digestión y la reacción puede inactivarse calentando la muestra a 65°C durante 5-10 minutos.

TRANSFERENCIA DE DNA TIPO SOUTHERN.

Para transferir el DNA de un gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa o nylon se utilizó un procedimiento modificado de la transferencia por el método de Southern (91, 129) para obtener dos copias de un mismo gel, el procedimiento es el siguiente:

- Digerir el DNA deseado con la enzima de restricción requerida y correr el gel de agarosa poniendo en un carril, de preferencia en el primero, un marcador de peso como DNA de fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III o Ladder de 1 Kb.

- Retirar el gel de la cámara, usando guantes, una vez que terminó la electroforesis, marcar el gel de un extremo haciendo un corte en una de las esquinas inferiores.

- Observar el gel con luz ultravioleta y tomar una fotografía poniendo una regla fluorescente en un extremo, de preferencia cerca del marcador de peso.

- Poner el gel en una charola y practicar el siguiente procedimiento:

- 1) Agregar una solución de HCl 0.25 N a que cubra el gel agitando suavemente durante 15 minutos para que suceda una depurinación ácida.

2) Retirar la solución y enjuagar con agua.

3) Agregar una solución de NaOH 0.5 M + NaCl 1.0 M a que cubra el gel agitando suavemente durante 45 minutos para que ocurra una desnaturalización alcalina.

4) Retirar la solución anterior y agregar una solución de tris 0.5 M pH 7.5 + NaCl 1.5 M a que cubra el gel agitando suavemente por 45 minutos o más para neutralizar. Enjuagar con agua.

- Hervir 5 minutos los filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell de 0.45 μm) para eliminar la capa de detergente que tienen en la superficie.

- Poner los filtros en una solución salina de citratos 6 X (SSC) por un momento.

- Tomar el gel con guantes y ponerlo sobre un vidrio, tomar un filtro de nitrocelulosa y ponerlo sobre el gel en un solo movimiento, cuidar que no queden burbujas entre ellos.

- Poner 3 capas de papel absorbente sobre el filtro y después 8-10 cm de servitoallas dobladas a la mitad y un vidrio.

- Invertir todo el paquete, quitar el vidrio que está en contacto con el gel y poner un filtro de nitrocelulosa. Repetir el procedimiento del inciso anterior.

- Al final poner un matraz con 1 litro de agua sobre el vidrio superior.

- Al día siguiente retirar las servitoallas y el papel absorbente, tomar los filtros con guantes y marcar los carriles con bolígrafo antes de separarlos del gel, también se puede marcar el número del gel, la fecha, etc.. Retirar los filtros con cuidado y

ponerlos entre servitoallas para secar en el horno de vacío a 80°C durante 2 horas. Guardar en una bolsa de plástico hasta el momento de usarse.

SOLUCION SALINA DE CITRATOS 20 X (SSC).

H ₂ O aforar a	1000 ml
NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g

MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA.

El DNA se marca con ³²P por un procedimiento de corte y reparación de DNA (Nick Translation) (Rigby 1977), para esto se usa un estuche comercial y αCTP-³²P, la descripción de la técnica se incluye en un pequeño manual que se incluye en el estuche. En este procedimiento es necesario trabajar con algunas protecciones para evitar la exposición a las radiaciones β. Para esto se requiere de una mampara de acrílico, guantes desechables, papel protector y papel aluminio para la mesa de trabajo, caja de acrílico para desechos sólidos, frascos irrompibles para desecho de líquidos y de ser posible un mandil de plomo. La reacción se hace en un tubo eppendorf nuevo esterilizado.

- Reacción:

DNA	10-50 ng
H ₂ O	aforar a 50 μl
Sol.1 estuche	10 μl
Sol.2 estuche	10 μl
³² P-CTP	10 μci

- Agitar el tubo y centrifugar 30 segundos en la

microcentrífuga.

- Poner el tubo en un baño de agua a 12-14°C por 2 horas.

- Preparar una columna en una jeringa de 1 ml con un poco de fibra de vidrio en el fondo, empacar hasta la marca de 1 ml con resina hidratada Sephadex G-75.

- Equilibrar la resina con 5 ml de solución amortiguadora para la reacción de corte y reparación.

- Al término de la reacción agregar a la muestra 250 μ l de solución amortiguadora para la reacción de corte y reparación, mezclar y poner en la columna todo el volumen, dejar salir todo el líquido. Agregar 600 μ l de solución amortiguadora para la reacción de corte y reparación a la columna y recolectar todo el líquido, en esta fracción se recupera el DNA marcado.

- Guardar el DNA marcado a -20°C dentro de una caja de acrílico especial para compuestos radiactivos.

SOLUCIONES DEL ESTUCHE DE CORTE Y REPARACION DE DNA.

1) Solución 1.

Solución amortiguadora: tris pH 7.8, MgCl₂, 2-mercaptoetanol.

Nucleótidos: d ATP 100 μ m, d GTP 100 μ m, d TTP 100 μ m.

2) Solución 2.

Solución amortiguadora: tris pH 7.5, MgCl₂, glicerol, albúmina sérica bovina.

Enzimas: 5 unidades/10 μ l de DNA polimerasa 1.

SOLUCION AMORTIGUADORA PARA LA REACCION DE CORTE Y REPARACION.

Tris	10 mM pH 8
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM pH 8
SDS	0.01 %

Esta solución amortiguadora puede prepararse a partir de soluciones concentradas y almacenarse a temperatura ambiente.

HIBRIDIZACION.

Para detectar secuencias en el DNA genómico homólogas al DNA usado como detector, se puede hacer una hibridización. Este procedimiento se lleva cabo en dos etapas, una etapa preparativa llamada prehibridización y la otra etapa llamada hibridización en donde se pone en contacto el DNA marcado radiactivamente usado como detector o probador con el DNA adherido al filtro de nitrocelulosa (91). Los componentes de la solución, así como la temperatura de incubación, se modifican de acuerdo al grado de homología entre el problema y el detector, de manera que existen condiciones de hibridización relajadas, intermedias y estrictas. En este trabajo las condiciones de hibridización son estrictas pues los detectores son homólogos a los problemas.

PREHIBRIDIZACION.

- Humedecer los filtros de nitrocelulosa en solución 6 X SSC y ponerlos en una bolsa de polietileno.

- Agregar 1 ml por carril de una solución que contiene:

SSC	6 X
Denhardt's	10 X
Tris HCl pH 7.5	10 mM
DNA timo de ternera	50 µg/ml

NOTA: Hervir el DNA de timo de ternera 5 minutos en baño Ma. y enfriar rápidamente en hielo por 5 minutos antes de agregar a la solución.

- Sacar todas las burbujas de la bolsa y sellarla con calor.
- Incubar la bolsa a 65°C por lo menos 2 horas, se puede incubar toda la noche asegurándose que la bolsa esté perfectamente sellada para evitar que se evapore el líquido.

HIBRIDIZACION.

- Trabajar con las mismas protecciones que para el marcaje del DNA.

- Usando guantes desechables, sacar de la bolsa toda la solución de prehibridización por un pequeño corte hecho en una esquina de la bolsa.

- Poner la bolsa tras la mampara de acrílico y agregar 0.5 ml por carril de la siguiente solución:

SSC	6 X
Denhart's	10 X
Tris HCl pH 7.5	10 mM
DNA timo de ternera	50 µg/ml
DNA ³² P	1.5x10 ⁶ c.p.m.

NOTA: Hervir el DNA de timo de ternera y del probador marcado, durante 5 minutos a baño Ma., enfriar rápidamente en hielo por 5 minutos antes de agregar a la solución.

- Sacar todas las burbujas de la bolsa cuidando que no quede ninguna entre el gel y la bolsa, sellar con calor perfectamente para que no haya fugas.

- Incubar los filtros, dentro de una caja de acrílico, a 65°C por toda la noche.

- Poner la bolsa y un contenedor para líquidos radiactivos tras la mampara de acrílico . Sacar toda la solución de hibridización haciendo un pequeño corte en la bolsa (desechar en el contenedor), por el mismo corte agregar 10 ml de solución SSC 0.1 X a temperatura ambiente, enjuagar desechando la solución en el contenedor.

- Cortar la bolsa en tres de sus lados, usando guantes, sacar el filtro, ponerlo en un recipiente con solución 0.1 X SSC + 0.1 % SDS a 55°C por 30 minutos.

NOTA: A partir de este paso se puede trabajar sin protecciones, usando los guantes solamente para no contaminar el filtro con nuestras manos.

- Monitorear el filtro con el contador Geiger para determinar la cantidad de radiactividad presente después del lavado. Repetir los lavados hasta que los filtros queden limpios, esto se determina monitoreando las esquinas del filtro.

- Lavar el filtro con una solución 0.1 X SSC por 15 minutos a temperatura ambiente.

- Secar el filtro entre servitoallas a temperatura ambiente o a 65°C por 5 minutos.

- Montar el filtro seco sobre una cartulina o un papel grueso y cubrirlo con un protector plástico (Kleen pack), cuidar que no queden arrugas.

- Poner el cartón con el filtro en un cassette para radiografía. En un cuarto oscuro poner 2 placas de radiografía sobre el cartón, cerrar perfectamente el cassette, conservarlo en

un congelador a -70°C por lo menos durante 1 día.

- Revelar una de las placas de radiografía. Volver a congelar el cassette en caso necesario.

SOLUCIONES NECESARIAS PARA LA HIBRIDIZACION.

1) Solución salina de citratos 20 X.

Descrito en el procedimiento de la transferencia de DNA tipo Southern.

2) Denhardt's 50 X.

H ₂ O aforar a	500 ml
Ficoll tipo 400	5 g
Polivinilpirrolidona	5 g
Albúmina sérica bovina fracción V	5 g

Filtrar por filtro de $1.2\ \mu$. Alicuotar y almacenar a -20°C .

3) DNA de timo de ternera.

DNA timo de ternera	10 mg/ml
---------------------	----------

Disolver el DNA agitando por 2 a 4 horas en un agitador magnético a temperatura ambiente. Pasar la solución de DNA varias veces por una jeringa desechable con una aguja lo más delgada posible. Hervir la solución en baño Ma. por 10 minutos. Leer la densidad óptica en el espectrofotómetro a 260 nm contra un blanco de agua para conocer la concentración exacta. Alicuotar y almacenar a -20°C .

4) Revelador y fijador Kodak (cat. 190-1859).

SIMBIOSIS R. phaseoli - Phaseolus vulgaris (FRIJOL).

Para observar el comportamiento de las cepas durante la

simbiosis con el frijol, se hace el crecimiento de las plantas en macetas llenas con verniculita como soporte, regadas con una solución de sales sin nitrógeno (21) e infectadas con la bacteria.

El procedimiento es el siguiente:

- Esterilizar en autoclave 2 o más charolas de aluminio con 3 capas de servitoallas y una de sanitas en el fondo, humedecidas con agua, cubiertas con papel aluminio.

- Tomar \approx 200 g de frijol Negro jamapa quitando todo el que esté roto, arrugado, sea de otra especie, etc.

- Lavar el frijol con agua.

- Escurrir y agregar etanol al 80 %. Reposar durante 5 minutos.

- Enjuagar varias veces con agua estéril.

- Agregar hipoclorito de sodio al 50 %. Reposar 15 minutos.

Escurrir.

- Agregar hipoclorito de sodio al 20 %. Reposar 20 minutos.

Escurrir.

- En condiciones de esterilidad, enjuagar con agua estéril hasta que desaparezca el olor a cloro.

- Remojar en agua, dentro de un área estéril, por 1 o 2 horas.

- Tomar los frijoles con pinzas flameadas y acomodarlos en las charolas estériles con una separación de 1.5 cm entre cada uno. Germinar 3 veces más cantidad de los frijoles necesarios. Tapar las charolas con el mismo papel aluminio.

- Incubar a 26 ~ 30 °C durante 3 días para que germinen las semillas.

- Usar macetas de 15 cm de alto por 22 cm de diámetro superior. Llenar las macetas con verniculita, apretando un poco para que quede compacta. Tapar cada maceta con un plato del número 9 con 6 orificios de 2 cm de diámetro distribuidos simétricamente. Asegurar el plato a la maceta con cinta adhesiva gruesa. Tapar cada orificio con un poco de algodón.

- Esterilizar las macetas en autoclave por 1 hora.

- Preparar el medio nutritivo para las plantas y esterilizarlo.

- Poner un frijol germinado, después de tres días de incubación, en cada orificio del plato que tapa a las macetas, introduciéndolo solamente a 1 cm de profundidad, cuidando que no se rompa.

- Regar las macetas con 500 - 800 ml de medio (83 - 133 ml por orificio).

- Infectar los frijoles con la cepa que se quiere probar a los cuatro días de su estancia en la maceta.

- A partir de las cepas a probar recientes estriadas en caja, sembrar un matraz con 100 ml de medio rico y antibióticos, incubar a 30°C 200 rpm por 16 - 18 horas.

- Centrifugar el cultivo a 4°C por 10 minutos a 10,000 rpm.

- Lavar la pastilla celular con 50 ml de agua estéril.

- Centrifugar el cultivo a 4°C por 10 minutos a 10,000 rpm.

- Resuspender la pastilla celular en 6 ml de agua estéril.

- Hacer una dilución de 200 veces y leer a 540 nm en el espectrofotómetro contra un blanco de agua.

- Calcular el volumen necesario para infectar cada frijol con 1 D.O. en un volumen entre 0.5 y 1 ml.

- Dejar una maceta como control sin infectar y otra sin infectar pero con nitrógeno.

- Regar cada planta del control con nitrógeno, con 5 ml de KNO_3 50 mM al cuarto día que se infectaron las otras plantas.

- Regar las macetas con 500 ml de medio Fahraeus una semana y otra semana con 500 ml de agua.

- A la cuarta semana de crecimiento regar nuevamente el control con nitrógeno con la misma cantidad de nitrato de potasio.

- Sacar las plantas de la maceta cuando tengan entre 24 y 31 días de crecimiento, sacar cada planta con parte de su raíz y hacer las determinaciones requeridas.

MEDIO FAHRAEUS.

Este medio se prepara concentrado y debe diluirse y completarse antes de usarse. La razón de hacerlo concentrado es porque se requiere de un gran volumen total para regar las plantas, y resulta más práctico esterilizar el agua y después diluir el medio.

SOLUCION CONCENTRADA DE SALES 1000 X

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.0 mM
KH_2PO_4	0.7 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.4 mM

Esterilizar en autoclave.

CaCl₂, 1000 X PARA MEDIO FAHRAEUS.

CaCl₂ · 2H₂O 0.7 M

Esterilizar en autoclave.

FeCl₂, 1000 X PARA MEDIO FAHRAEUS.

FeCl₂ 0.0005 %

Esterilizar por filtración y conservar en refrigeración.

SOLUCION 1000 X DE ELEMENTOS TRAZA (GIBSON) PARA MEDIO FAHRAEUS.

	500 ml
H ₃ BO ₃	1.430 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	1.015 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.110 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.040 g
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.050 g

Preparar la solución con anticipación y almacenar en frasco ámbar en refrigeración, esterilizar en autoclave solamente la cantidad necesaria.

MEDIO FAHRAEUS COMPLETO.

Para preparar el medio final se usan las soluciones concentradas, por cada litro de medio se agregan 1 ml de solución de sales, 1 ml de la solución de fierro, 1 ml de la solución de calcio y 1 ml de la solución de los elementos traza.

SOLUCION 100 X DE LA FUENTE DE NITROGENO.

KNO₃ 10 mM

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA EN NODULOS.

Para conocer la actividad enzimática de la nitrogenasa

presente en los nódulos de la raíz de la planta, se determina la cantidad de etileno producido de la reducción del acetileno por la acción de la enzima (21, 138). El procedimiento es el siguiente:

- Sacar cada planta de la maceta con parte de su raíz. Sacudirla para quitar la verniculita, cortar la raíz.

- Meter las plantas de una maceta en una bolsa de papel de estraza de tamaño adecuado.

- Secar las plantas a 55°C por 2 o 3 días. Pesarlas.

- Meter la raíz de dos plantas en un frasco de vidrio de 200 ml, taparlo con un tapón vacutainer.

- En un matraz aparte hacer una reacción de carburo de calcio con agua para producir acetileno:



- Con una jeringa tomar 3 ml del acetileno formado e inyectarlos al frasco que tiene la raíz. En este momento empezar a contar el tiempo.

- Transcurrida una hora, tomar 1 ml del gas de la botella e inyectarlo en un tubo vacutainer.

- A las dos horas tomar otro mililitro y ponerlo en otro tubo vacutainer.

- Hacer el mismo procedimiento en un frasco sin raíz para usarlo como control.

- Analizar la composición de la mezcla de gases en un cromatógrafo de gases con una columna Porapak "N" de 80/100 2 metros por 1/8" S.S. de Varian.

- Las condiciones de operación del cromatógrafo varían de un

equipo a otro, en este caso particular son:

Temperatura de la columna	105°C
Temperatura del inyector	110°C
Temperatura del detector	110°C

Mezcla de gases:

Nitrógeno	30 ml/min
Hidrógeno	30 ml/min
Aire	300 ml/min

- Los datos obtenidos en el cromatógrafo son % de área, tiempo de retención y área bajo la curva. Los picos se identifican fácilmente por su tiempo de retención.

- Sacar la raíz del frasco y desnodular, poner los nódulos de cada botella en un tubo, un tubo por cada botella, al término de las reacciones de nitrogenasa.

- Secar los nódulos a 55°C por 2 o 3 días.

- Pesar los nódulos secos.

- Calcular el % de etileno por hora por gramo de nódulo, para ello tomar la lectura de la reacción a las dos horas, dividir entre dos para obtener el resultado en una hora y dividir entre el peso seco de los nódulos de esa muestra. Con los datos de cada muestra hacer un promedio para obtener los resultados por cepa y por condición.

DETERMINACION DEL FENOTIPO DE LOS BACTEROIDES DEL NODULO.

- Tomar al azar algunos nódulos de cada cepa y ponerlos en agua por 5 minutos.

- Trabajar en área estéril de aquí en adelante.

- Decantar con cuidado, agregar una solución de hipoclorito de

sodio al 20%, reposar por 5 minutos.

- Decantar con cuidado, enjuagar con agua estéril por lo menos 5 veces.

- Tomar un nódulo con unas pinzas flameadas, escurrirlo y rodarlo por una pequeña parte de una caja Petri con medio rico con los antibióticos de resistencia de la cepa.

- Apretar el nódulo con las pinzas para romperlo, esparcir un poco su contenido sobre la caja. Poner el nódulo a un lado porque se produce un color negro en la incubación y puede interferir para apreciar las colonias.

- Incubar las cajas a 29°C durante 2 o 3 días.

- Escoger las colonias más aisladas y picarlas en cajas Petri con diferentes medios para checar el fenotipo de las bacterias contenidas en el nódulo.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Las cepas mutantes de R. phaseoli, llamadas LM01, LM11 y LM13, fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. Calderón mediante una mutagénesis con un transposón (Tn5) y fueron seleccionadas por su incapacidad para crecer en glutamina como fuente de nitrógeno y carbono. Estas mutantes están alteradas tanto en la utilización de la glutamina como del glutamato.

En experimentos previos, se caracterizaron estas mutantes en cuanto a su capacidad para crecer en un medio mínimo con diferentes aminoácidos como fuente de nitrógeno y carbono y en medio mínimo con el aminoácido más una buena fuente de carbono como succinato.

Analizando las curvas de crecimiento de las mutantes en los diferentes medios, se observó que la mutante LM01 no crece en medio mínimo con glutamina o con glutamato como fuente de carbono y nitrógeno ni en medio mínimo glutamato más succinato como fuente de carbono, que crece mal en alanina y asparagina como fuente de carbono y nitrógeno pero que en medio rico (Py) crece como la cepa silvestre, así como en los medios mínimos con glutamina, alanina, aspartato y amonio, como fuentes de nitrógeno, más succinato como fuente de carbono. Se observó que la mutante LM01 es diferente a las mutantes LM11 y LM13, ya que estas mutantes sí fueron capaces de crecer en medio mínimo glutamato más succinato y ambas presentaban un fenotipo muy similar, ya que no se observaron diferencias significativas entre sus crecimientos en los diferentes medios.

Con base en el análisis de las cinéticas de crecimiento, se propuso que las mutantes podrían estar alteradas en la degradación del glutamato porque la glutamina y otros aminoácidos se degradan a esqueletos de carbono a través de dar glutamato como producto intermediario. Por lo tanto, se decidió hacer las determinaciones de las actividades enzimáticas de algunas de las enzimas que participan en el catabolismo del glutamato y que se pensó podrían estar afectadas por las mutaciones, así, se hicieron las determinaciones enzimáticas de dos enzimas, la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la alanino deshidrogenasa (ADH).

La actividad enzimática de la GDH se determinó por su actividad biosintética y por su actividad catabólica. En los resultados reportados en las tablas 2 y 3 se puede observar que las mutantes LM11 y LM13 presentaron una actividad de GDH biosintética y catabólica muy similar a la que presentó la cepa silvestre, mientras que la mutante LM01 tuvo aproximadamente la mitad de la actividad de ambas determinaciones con respecto a la misma cepa.

En cuanto a la actividad enzimática de la ADH biosintética y catabólica, podemos ver que las tres mutantes presentaron aproximadamente la mitad de la actividad con respecto a la cepa silvestre (Tabla 4 y 5).

TABLA 2.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GDH BIOSINTETICA DE LAS MUTANTES LM01, LM11 Y LM13 Y LA CEPA SILVESTRE DE Rhizobium phaseoli.

CEPA	ACTIVIDAD ESPECIFICA*
	nmol/min/mg P
CE3	25.57
LM01	13.39
LM11	35.84
LM13	37.40

* La actividad de GDH biosintética se determinó a las ocho horas de crecimiento en medio mínimo glutamato.

TABLA 3.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GDH CATABOLICA DE LAS MUTANTES LM01, LM11 Y LM13 Y LA CEPA SILVESTRE DE Rhizobium phaseoli.

CEPA	ACTIVIDAD ESPECIFICA*
	nmol/min/mg P
CE3	6.85
LM01	2.91
LM11	6.57
LM13	6.61

* La actividad de GDH catabólica se determinó a las ocho horas de crecimiento en medio mínimo glutamato.

TABLA 4.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADH BIOSINTETICA DE LAS MUTANTES LM01, LM11 Y LM13 Y LA CEPA SILVESTRE DE Rhizobium phaseoli.

CEPA	ACTIVIDAD ESPECIFICA*
	nmol/min/mg P
CE3	154.86
LM01	70.99
LM11	82.54
LM13	88.20

* La actividad de ADH biosintética se determinó a las 8 horas de crecimiento en medio mínimo alanina.

TABLA 5.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ADH CATABOLICA DE LAS MUTANTES LM01, LM11 Y LM13 Y LA CEPA SILVESTRE DE Rhizobium phaseoli.

CEPA	ACTIVIDAD ESPECIFICA*
	nmol/min/mg P
CE3	39.72
LM01	4.91
LM11	4.33
LM13	4.67

* La actividad de ADH catabólica se determinó a las 8 horas de crecimiento en medio mínimo alanina.

Los resultados obtenidos de las actividades de la GDH sugieren que las actividades biosintética y catabólica son catalizadas por la misma enzima ya que su actividad varía en la misma relación en las diferentes cepas de Rhizobium, de igual manera sucede con las actividades de la ADH, por lo que estos datos también indican que la ADH cataliza la reacción biosintética y catabólica.

El hecho de que la mutante LM01 presente una actividad baja tanto de la GDH como de la ADH, indica que esta es una mutante regulatoria que afecta varias enzimas catabólicas.

La baja actividad de la ADH que presentan las mutantes LM11 y LM13 sugiere que la mutación que las afecta es regulatoria aunque es probable que las mutantes estén alteradas en otras enzimas que participan en el catabolismo de aminoácidos, ya que la disminución de la actividad de la ADH no explica el hecho de que no puedan crecer en glutamato como fuente de carbono y nitrógeno.

Para conocer el papel del catabolismo de aminoácidos durante la simbiosis, se determinó el fenotipo simbiótico de las mutantes LM01, LM11 y LM13. Para determinar el efecto de la mutación durante la simbiosis de Rhizobium con el frijol, se hicieron experimentos en maceta con las 3 mutantes usando como control a la cepa silvestre así como un control sin inóculo y un control sin inóculo pero con nitrato como fuente de nitrógeno. En este experimento se determinó la nodulación y la actividad enzimática de la nitrogenasa que es la enzima que nos indica la fijación de nitrógeno.

Se usaron 4 macetas con 6 plantas cada una para cada una de las mutantes y para la cepa silvestre y 2 macetas con seis plantas

cada una, para el control sin inóculo y para el control sin inóculo con nitrógeno. La nodulación y la actividad de nitrogenasa se determinaron a los 31 días de infección de las plantas.

Como se puede observar en la Tabla 6, la mutante LM01 noduló un 70% menos que la cepa silvestre y no fijó nitrógeno, mientras que las mutantes LM11 y LM13 tuvieron un comportamiento similar entre ellas pues casi no nodularon y no fijaron nitrógeno.

TABLA 6.

DETERMINACION DE LA NODULACION Y LA FIJACION DE NITROGENO DE LAS MUTANTES LM01, LM11 Y LM13 Y LA CEPA SILVESTRE DE Rhizobium phaseoli.

CEPA	PESO DE NODULOS POR MACETA g / 6 PLANTAS	ACTIVIDAD DE NITROGENASA % ETILENO / h / g nódulo
CE3	0.547	15.14
LM01	0.145	N.D.
LM11	0.04	N.D.
LM13	0.029	N.D.

Para demostrar que la bacteria que infectó a la planta era la misma con que se infectó inicialmente, se determinó el fenotipo de los bacteroides contenidos en el nódulo. Para esto se tomaron al azar 3 nódulos de cada cepa y se exprimieron en cajas de medio rico (Py), de ahí se tomaron bacterias aisladas y se probaron en diferentes medios. Como se puede observar en la Tabla 7, el fenotipo de las bacterias aisladas de los nódulos del frijol correspondió al fenotipo de la cepa con que fueron infectadas.

TABLA 7.

DETERMINACION DEL FENOTIPO DE LOS BACTEROIDES DE LAS
MUTANTES LM01, LM11 Y LM13 Y LA CEPA SILVESTRE DE
Rhizobium phaseoli.

CEPA	Py nal	Py kn	MM gln suc.	MM gln	LB
CE3	+++	-	+++	++	-
LM01	+++	+++	+	-	-
LM11	+++	+++	++	-	-
LM13	+++	+++	+	-	-

El hecho de que las mutantes LM01, LM11 y LM13 nodulen muy poco y no fijen nitrógeno, indica que el catabolismo de aminoácidos es esencial para que se lleve a cabo una simbiosis efectiva entre Rhizobium phaseoli y Phaseolus vulgaris (Frijol).

En base a los resultados obtenidos podemos decir que es probable que las mutantes LM11 y LM13 sean similares ya que presentan el mismo efecto de nodulación durante la simbiosis y el mismo comportamiento en el crecimiento en diferentes medios, mientras que la mutante LM01 parece ser diferente a las otras dos mutantes pues no puede crecer en medio mínimo glutamato succínico y durante la simbiosis con la planta nodula 70 % menos que la cepa silvestre y no fija nitrógeno.

Con objeto de determinar la presencia del transposón en las mutantes y conocer el tamaño del fragmento de DNA que está interrumpiendo, así como la homología de ese fragmento entre las tres mutantes, se hicieron extracciones del DNA total de las

mutantes y de la cepa silvestre para hibridizar contra el Tn5. El DNA de las mutantes y del plásmido que contiene al Tn5 se digirió con EcoR1 y con BamH1 y el DNA de la cepa silvestre se digirió con EcoR1 ya que se usó solamente como control negativo en la hibridización. La hibridización se hizo en las condiciones reportadas en materiales y métodos y se muestra en la figura 4.

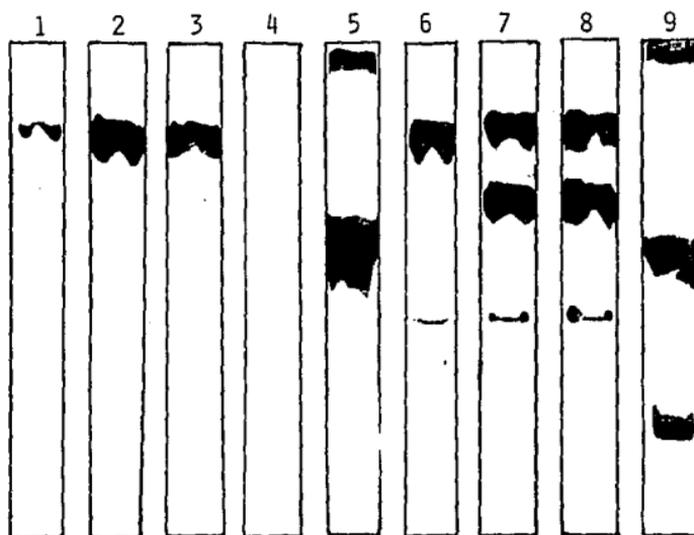


FIGURA 4.
HIBRIDIZACIONES vs Tn5.

1) LM01 digerida con EcoR1. 2) LM11 digerida con EcoR1. 3) LM13 digerida con EcoR1. 4) CE3 digerida con EcoR1. 5) Tn5 digerido con EcoR1. 6) LM01 digerida con BamH1. 7) LM11 digerida con BamH1. 8) LM13 digerida con BamH1. 9) Tn5 digerido con BamH1.

En la hibridización del DNA de las tres mutantes, digerido con EcoR1, contra Tn5, observamos una región homóloga que se encuentra en un fragmento de aproximadamente 13 Kb, de las cuales 7.5 Kb corresponden al Tn5 y el resto al DNA de la mutante, mientras que en la hibridización contra el DNA de las mutantes, digerido con BamH1, se observaron tres fragmentos de aproximadamente 8 Kb, 3 Kb y 1.5 Kb en las mutantes LM11 y LM13 y tres fragmentos de 7.8 Kb, 7 Kb y 1.5 Kb en la mutante LM01. Estos resultados sugieren que las mutantes LM11 y LM13 tienen insertado el transposón en el mismo sitio porque presentan las mismas bandas de homología y que son diferentes a la mutante LM01 porque esta presenta un patrón diferente (Fig. 4).

En base a los resultados obtenidos se decidió continuar el trabajo con la mutante LM01 porque alteraba tanto la nodulación como la fijación de nitrógeno y no crecía en medio mínimo glutamato succínico, pero debido a que fisiológicamente parecía tener un efecto pleiotrópico, se decidió hacer una caracterización de la mutación a nivel molecular como una forma más directa para conocer el fragmento afectado por la mutación.

Para caracterizar molecularmente a la mutante LM01, se decidió clonar el fragmento de DNA que complementa a esta mutante, utilizando un banco de genes de *R. phaseoli* en *E. coli* que contiene el genoma completo representado por lo menos 3 veces. Para esto se hizo una cruce triparental con el plásmido ayudador pRK2073, el banco genómico y la mutante LM01, los medios de selección y control fueron: Py ácido nalidíxico para conocer la proporción de Rhizobium

existente en la cruz, LB para conocer la proporción de E. coli, Py ácido nalidíxico tetraciclina para conocer la eficiencia de la cruz y medio mínimo glutamina ácido nalidíxico tetraciclina como medio de selección.

De la complementación con el banco se obtuvieron varias colonias en el medio selectivo, se eligieron diez de ellas y se purificaron en medio rico. Una vez purificadas, se sembraron en medio rico con diferentes antibióticos, así como en los medios de control y de selección para observar el fenotipo.

Cuando se confirmó la pureza de las colonias obtenidas de la complementación de la mutante, se hicieron extracciones del DNA del plásmido introducido, una pequeña cantidad del DNA obtenido se utilizó para checar en un gel la pureza y el resto se usó para transformar la cepa HB101 de E. coli, con el fin de que el plásmido se replique en una cepa de la cual es más sencillo hacer las extracciones y por lo tanto se puede obtener una mayor cantidad de DNA para ser usado en experimentos posteriores.

Una vez que tuvimos los plásmidos que complementaron a la mutante LM01 en E. coli, se hicieron nuevamente cruizas triparentales con la mutante. En el análisis de estas cruizas se encontró que todos los plásmidos volvieron a complementar la mutación, demostrando así que realmente se trató de una complementación y no de una reversión de la mutación.

Para determinar el grado de homología entre los diferentes plásmidos obtenidos, se preparó DNA del plásmido, contenido en E. coli, de las diez colonias que se obtuvieron de la complementación

de la mutante y se checó su patrón de restricción con EcoR1 en un gel de agarosa (dato no mostrado). En el gel pudimos observar que 4 colonias presentaban un patrón idéntico y el resto presentaban fragmentos de diferentes pesos, pero que las 10 colonias contenían un fragmento de aproximadamente 2 Kb, esto puede deberse a que en la construcción del banco genómico se hacen digestiones parciales que dejan fragmentos de diferentes tamaños, por lo que un mismo gene puede estar en un fragmento de diferente tamaño y puede estar completo o dividido en un plásmido.

Haciendo esta consideración, se eligieron los 3 plásmidos más representativos de los 10 obtenidos. Los plásmidos idénticos se denominaron plásmido pMGD2 y se eligieron para ser usados como detector en experimentos de hibridización, porque además de ser los más abundantes, presentaban un patrón de restricción con menor número de bandas, los otros dos plásmidos elegidos se denominaron pMGD3 y pMGD4.

Para conocer el tamaño del fragmento de DNA que está interrumpido por el transposón y la homología de ese fragmento con el plásmido pMGD2, se hicieron extracciones del DNA total de la mutante y de la cepa silvestre para hibridizar contra Tn5 y contra el DNA del plásmido pMGD2.

Los plásmidos pMGD2, pMGD3, pMGD4 y el DNA total de la mutante LM01 y de la cepa silvestre fueron digeridos con EcoR1 y se corrieron en un gel de agarosa usando Ladder de 1 Kb como marcador de peso molecular. La fotografía del gel se muestra en la figura 5.

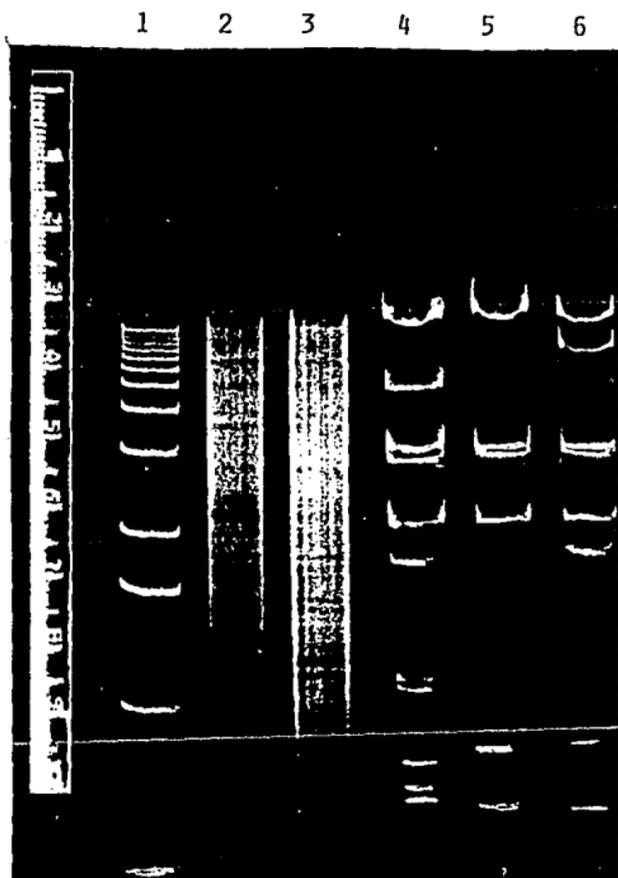


FIGURA 5.

ELECTROFORESIS DE DNA DE DIFERENTES CEPAS Y PLASMIDOS
DIGERIDOS CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *EcoRI*.

- 1) Marcador de peso molecular Ladder de 1 Kb. 2) DNA total de la cepa silvestre CE3. 3) DNA total de la mutante LM01. 4) Plásmido pMGD3. 5) Plásmido pMGD2. 6) Plásmido pMGD4.

En la hibridización contra el plásmido pMGD2, observamos que en la cepa silvestre hibridizó con dos fragmentos de alrededor de 3.2 Kb y 2 Kb mientras que en la mutante hibridizó con tres fragmentos de 8 Kb, 3.2 Kb y 2 Kb, dos de los fragmentos fueron del mismo peso de los que se observaron en la cepa silvestre y el otro fragmento se observó en la región en donde se encuentra el Tn5, lo que nos indica los dos fragmentos de DNA en la cepa silvestre son iguales a los correspondientes en peso en la mutante LM01, por lo que no es posible pensar que alguno de esos fragmentos sea el que se encuentra interrumpido por el Tn5 pues en ese caso hubiera desaparecido un fragmento en esa región en la mutante, ya que con la inserción del Tn5 habría aumentado de peso y se encontraría en la región en que se encuentra la banda de homología con el Tn5 que se mostró en la figura 4, por lo que la hibridización de la mutante con el pMGD2 mostraría solamente dos bandas de homología.

La homología que presenta el plásmido pMGD2 con la región en que se encuentra el Tn5 puede tener varias explicaciones, una de ellas es que el transposón se encuentre insertado en un fragmento de bajo peso molecular y que resulte imposible detectarlo en la cepa silvestre, porque generalmente en las regiones de bajo peso las señales positivas son muy débiles y difícilmente se observan. Esta idea surgió porque el plásmido pMGD2 presenta 2 fragmentos pequeños en su patrón de restricción con EcoR1 y aún cuando no sabemos si son los responsables de la complementación, sí podrían ser parte del gene en cuestión.

Otra posibilidad en cuanto a la homología con la región en que

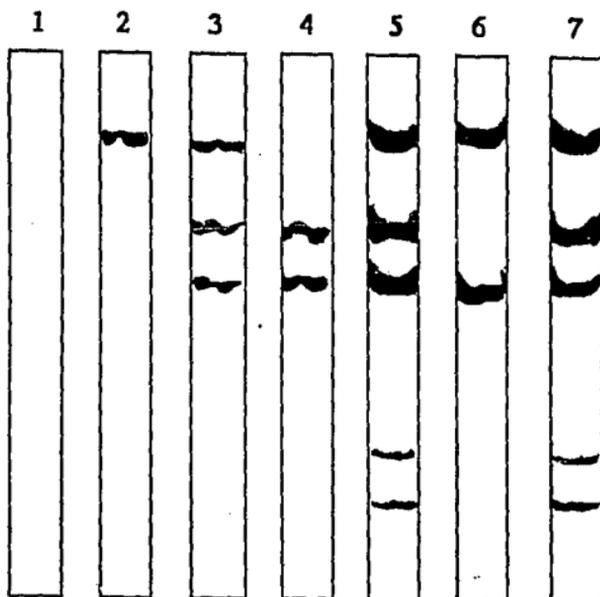


Figura 6.

HIBRIDIZACIONES:

- 1) Cepa silvestre CE3 vs Tn5-mob. 2) Mutante LM01 vs pMGD2. 3) Mutante LM01 vs pMGD2. 4) Cepa silvestre CE3 vs pMGD2. 5) Plásmido pMGD3 vs pMGD2. 6) Plásmido pMGD4 vs pMGD2. 7) Plásmido pMGD2 vs pMGD2.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

se encuentra el Tn5, es el hecho de que existe homología entre el vector (pLAFR1) del plásmido pMGD2 y el Tn5-mob que se encuentra insertado en la mutante, ya que ambos presentan la región de origen de transferencia (Mob) y la hibridización podría ser debida a esta homología. Esto podría indicarnos que la mutación complementada no es la causada por el Tn5 y que la mutación que confiere el fenotipo a la mutante LM01 pudo ser el resultado de una mutación espontánea.

En cuanto a la hibridización del pMGD2 con los otros dos plásmidos, se observó que uno de ellos, el plásmido pMGD3, presentó una región homóloga de aproximadamente 2 Kb y el otro plásmido, pMGD4, presentó varias regiones homólogas como son un fragmento de 3 Kb, otro de 2 Kb y dos fragmentos pequeños de aproximadamente 0.8 y 0.6 Kb, lo que nos sugiere que el gene involucrado en la complementación puede encontrarse dividido en diferentes fragmentos, aunque lo más probable es que pueda encontrarse en el fragmento de 2 Kb. Estos resultados se observan en la figura 6.

Los experimentos posteriores a la terminación de este trabajo demostraron que la mutante complementada con uno de los plásmidos, el llamado pMGD4, logra recuperar su capacidad para crecer en todos los medios de manera muy similar a la cepa silvestre y que durante la simbiosis con la planta produce nódulos y hay fijación de nitrógeno.

El plásmido pMGD4 se subclonará y se secuenciará para que, a través de estudios comparativos, se pueda deducir cual es la función del gene que se afectó en la mutante LM01.

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo muestran que se cumplió con los objetivos propuestos, ya que al inicio se había propuesto que las mutantes LM01, LM11 y LM13 podrían estar alteradas en la degradación de glutamato y con base en el análisis de las cinéticas de crecimiento y con los datos obtenidos de las determinaciones enzimáticas, es posible concluir que las tres mutantes están alteradas en la degradación de glutamato, que las mutantes LM11 y LM13 parecen ser similares, que la mutación que tienen puede ser regulatoria y que es probable que estas mutantes estén alteradas en otras enzimas que participan en el catabolismo de aminoácidos. Respecto a la mutante LM01 podemos decir que es diferente a las mutantes LM11 y LM13 y que la mutación que presenta probablemente sea regulatoria, ya que tiene un efecto pleiotrópico porque afecta varias enzimas catabólicas.

Con los experimentos de hibridización contra el Tn5 podemos concluir que las mutantes LM11 y LM13 son similares y son diferentes a la mutante LM01, porque tienen insertado el Tn5 en diferente sitio, como puede verse claramente en la figura 4, en donde se compara la hibridización contra el Tn5 de las mutantes digeridas con EcoR1 y con BamH1, lo que puede explicar las diferencias en los crecimientos en los diferentes medios y las diferencias en las actividades enzimáticas.

En cuanto a los efectos de las mutaciones durante la simbiosis de las mutantes con el frijol, también se llegó a la conclusión de

que las mutantes LM11 y LM13 son similares porque ninguna de ellas es capaz de nodular ni de fijar nitrógeno durante la simbiosis, mientras que la mutante LM01 puede nodular un 30 % con respecto a la cepa silvestre pero no puede fijar nitrógeno.

De la caracterización molecular de la mutante LM01, elegida porque resulta interesante el hecho de que nodule poco y no fije nitrógeno, se llegó a la obtención de un plásmido que complementa la mutación, de manera que la mutante complementada recupera su capacidad para crecer en todos los medios de manera muy similar a la cepa silvestre y durante la simbiosis con la planta produce nódulos y hay fijación de nitrógeno, con lo que concluimos que hemos clonado el locus que confiere el fenotipo a la mutante LM01, aún cuando al parecer el locus clonado no es el afectado por el transposón.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que, aún cuando todavía no conocemos la naturaleza del gene afectado por la mutación, sí podemos decir que es un gene importante para Rhizobium tanto en vida libre como en simbiosis, porque afecta no solamente su crecimiento en diferentes aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno, sino que también limita su crecimiento durante la simbiosis con la planta, lo que nos indica que el catabolismo del glutamato y de la glutamina son necesarios para una simbiosis efectiva entre Rhizobium phaseoli y Phaseolus vulgaris.

REFERENCIAS

1. Aguilar, O. M., Kapp, D. and Pühler, A. (1985). Characterization of a Rhizobium meliloti fixation gene (fixF) located near the common nodulation region. J. Bacteriol. 164: 245-249.
2. Alexander, M. (1980). Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. In: Advances in Microbial Ecology. Ed. M. Alexander. Plenum Publishing Corp. New York. p. 163-183.
3. Alexander, M. (1981). Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc. New York. p. 277-302.
4. Ali, H., Niel, C. and Guillaume, J. (1981). The pathway of ammonium assimilation in Rhizobium meliloti. Arch. Microbiol. 129: 391-394.
5. Arnold W., Andreas R., Klipp W., Priefer P., and Pühler A. (1988). Nucleotide sequence of a 24, 206- bases-pair DNA. Fragment carrying the entri nitrogen fixation gene cluster of Klebsiella pneumoniae. J. Mol. Biol. 203: 715-738.
6. Arwas, R., McKay, I. A., Rowney, F. R. P., Dilworth, M. J. and Glenn, A. R. (1985). Properties of organic acid utilization mutants of Rhizobium leguminosarum strain 300. J. Gen. Microbiol., 1313: 2059-2066.
7. Batut, J., Daveran-Mingit, M. L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A. M. and Kahn, D. (1989). Fix K, a gene homologus with fnr and crp from Escherichia coli, regulates nitrogen fixation genes positively and negatively in Rhizobium meliloti. EMBO J. 8: 1279-1286.
8. Belser, L. W. (1979) Population ecology of nitrifying bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 33: 309-312.
9. Bender, G. L., Goydych, W., Rolfe, B. G., and Nayudu, M. (1987). The role of Rhizobium conserved and host specific nodulation genes in the infection of the non-legume Parasponia andersonii. Mol. Gen. Genet. 210: 299-306.
10. Benyon, J. L., Williams, M. K. and Cannon, F. C. (1988). Expression and functional analysis of the Rhizobium meliloti nifA gene. EMBO J. 7: 7-13.
11. Bergersen, F. J. and Turner, G. L. (1988). Glutamate as a carbon source for N₂-fixing bacteroids prepared from soybean

- root nodules. J. Gen. Microbiol. 134: 2441-2448.
12. Bergman, K., Gualash-Hoffe, M., Huestadt, R. E., Larosiliere, R. C., Ronco, P. G. and Su, L. (1988). Physiology of behavioral mutants of Rhizobium meliloti: evidence for a dual chemotaxis pathway. J. Bacteriol. 170: 3249-3254.
 13. Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in R. leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 84: 188-198.
 14. Beringer, J. E., Brewin, N., Johnston, A. B. W., Schulman, H. M. and Hopwood, D. A. (1979). The Rhizobium-legume symbiosis. Proc. R. Soc. Lond. B. 204: 219-233.
 15. Bhuvanewari V., Turgeton G. and Bauter D. (1980). Early events in the infection of soybean (Glycine max L. Merr) by Rhizobium japonicum. Location of infectible roots cells. Plant Physiol. 66: 1027-1219.
 16. Birkenhead, K., Manian, S. S. and O'Gara, F. (1988). Dicarboxylic acid transport in Bradyrhizobium japonicum: use of Rhizobium meliloti gene(s) to enhance nitrogen fixation. J. Bacteriol. 170: 184-189.
 17. Bishop, P. E., Guevara, J. G., Engelke, J. A. and Evans, H. J. (1976). On the relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between Rhizobium japonicum and Glycine max. Plant Physiol. 57: 542-546.
 18. Boistar, P., Batut, J., Doveran, M. L. David, M., Garnerone, A. M., Li, R. Y. and Kahn, D. (1988). The regulatory pathway of nif and fix genes in Rhizobium meliloti. In Molecular Plant-microbe interactions. Ed. D.P.S. Verma y R. Palacios. APS Press. p. 96-100.
 19. Bottomley, P. J., K. Leung, S. R. Strain, K. Yak, N. Dashti and P. Claycomb (1990). The ecology of indigenous populations of Rhizobium leguminosarum bvs. trifolii and viceae. In: Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Ed. P.M. Gresshoff, L. Evans Roth, G. Stacey and W.E. Newton. Chapman and Hall, New York, USA, London, UK. p. 371-378.
 20. Boyer, H. B., Roulland-Dussaix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41: 459-472.
 21. Bravo, A., Becerril, B. and Mora, J. (1988). Introduction of the Escherichia coli gdhA gene into Rhizobium phaseoli: effect on nitrogen fixation. J. Bacteriol. 170: 985-988.
 22. Bravo, A. and Mora J. (1988). Ammonium assimilation in

Rhizobium phaseoli by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. J. Bacteriol. 170: 980-984.

23. Bravo, A., Martínez, L. M., Mora, Y., Du Pont G., Calderón, J. and Mora, J., (1990). A Rhizobium phaseoli mutant pleiotropically affects succinate utilization, GSII activity and N₂ fixation. In Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Ed P. M. Gresshoff, L. Evans Roth, G. Stacey y W. E. Newton. Chapman and Hall, New York, USA, London, UK. p. 516.
24. Buchanan-Wollaston, U., Cannon, M. C., Beynon, J. L. and Cannon, F. C. (1981). Role of the nifA gene product in the regulation of nif expression in Klebsiella pneumoniae. Nature. 294: 776-780.
25. Buikema, W. J., Klingensmith, J. A., Gibbons, S. L. and Ausubel, F. M. (1987). Conservation of structure and location of Rhizobium meliloti and Klebsiella pneumoniae nifB genes. J. Bacteriol. 169: 1120-1125.
26. Burgess, B. K. (1985). Nitrogenase mechanism an overview. In: Nitrogen fixation research progress. Newton et al. Eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, p. 543-550.
27. Burns, R. C. and Hardy W. F. (1975). Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag, New York, p. 100-103.
28. Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D. K. and Baver, W. D. (1988). Chemotaxis of Rhizobium meliloti to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. J. Bacteriol. 170: 3164-3169.
29. Callaham, D. A. and Torrey, J. G. (1981). The estructural basis for infection of root hairs of Trifolium repens by Rhizobium. Can. J. Bot. 59: 1647-1664.
30. Carlson, T. A., Guerinot, M. L. and Chelm, B. K. (1985). Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (glnA) from Bradyrhizobium japonicum. J. Bacteriol. 162: 698-703.
31. Carlson, T. A., Martin, G. B. and Chelm, B. K. (1987). Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of Bradyrhizobium japonicum. J. Bacteriol. 169: 5861-5866.
32. Corbin, D., Barran, L. and Ditta, G. (1983). Organization and expression of Rhizobium meliloti nitrogen fixation genes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80: 3005-3016.

33. David, M., Daveran, M. L., Batut, J., Dediev, A., Domergue, O., Ghal, J., Hertig, C., Boistard, P. and Kahn, D. (1988). Cascade of *nif* gene expression in Rhizobium meliloti. Cell 54: 672-673.
34. Davis, E. O., Evans, I. J. and Johnston, A. W. B. (1988). Identification of nodX, a gene that allows Rhizobium leguminosarum biovar viciae strain TOM to nodulate Afghanistan peas. Mol. Gen. Genet. 212: 531-535.
35. Dazzo, F. B. and Gardiol, A. (1984). Host specificity in Rhizobium-legume interactions. In: Genes involved in microbe plant interactions. New York Springer Publisher. Ed. D. P. S Verma. p. 3-31.
36. Debelle, F. and Sharma, S. B. (1986). Nucleotide sequence of Rhizobium meliloti RCR2011 gene involved in host specificity of nodulation. Nucl. Acids Res. 14: 7453-7472.
37. De Bruijn, F. J. and Ausubel, F. M. (1983). The cloning and characterization of the glnF (ntrA) gene of Klebsiella pneumoniae: role of glnF (ntrA) in the regulation of nitrogen fixation (nif) and other nitrogen assimilation genes. Mol. Gen. Genet. 196: 342-349.
38. De Bruijn, F. J. (1987). Tn5 mutagenesis to map genes. Meth. Enzymol. 154: 175-196.
39. De Bruijn, F. J., Rossbacj, S., Schneider, M., Ratet, P. Messemer, S., Szeto, W. W., Ausubel, F. M. and Schell, J. (1989). Rhizobium meliloti 1021 has three defferentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. 171: 1673-1682.
40. Delwiche C. C. (1970). The nitrogen cycle. Scient. Amer. 223: 136-146.
41. Delwiche C.C. (1981). The cycle of nitrogen and nitrous oxide. John Wiley and Sons, Inc. p. 1-15.
42. Dilworth, M. and Glenn (1984). How does a legume nodule work?. Trends Biochem. Sci. 9: 519-523.
43. Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X., Finlay, D., Guiney, D. and Helinski D. (1985). Plasmid related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. Plasmid 13: 149-153.
44. Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D. R. (1981). Cloning DNA from Rhizobium meliloti using a new broad

- host range, binary vehicle system. In "Basic Life Sciences" J. M. Lyons et al., eds. Plenum, New York. Vol. 17, p. 31-40.
45. Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of Rhizobium meliloti Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 7347-7351.
 46. Djordjevic, M. A., Schofiels, P. R., Ridge, R. W., Morrison, N. A., Basam, B. J., Plazinski, J., Watson, J. M. and Rolfe, B. H. (1985). Rhizobium nodulation genes involved in root hair curling (Hac) that are functionally conserved. Plant Mol. Biol. 4: 147-160.
 47. Djordjevic, M. A., Schofield, P. R. and Rolfe, B. G. (1985). Tn5 mutagenesis of Rhizobium trifolii host-specific nodulation genes results in mutants with altered host-range ability. Mol. Gen. Genet. 200: 463-471.
 48. Dowling, D. N. and W. J. Broughton (1986). Competition for nodulation of legume. Annu. Rev. Microbiol., 40: 131-135.
 49. Drummond, M., Clements, J., Merrick, M. and Dixon, R. (1983). Positive control and autogenous regulation of nifLA promoter in Klebsiella pneumoniae. Nature (London). 301: 302-305.
 50. Dudley, M. E., Jacobs, T. W. and Long, S. R. (1987). Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by Rhizobium meliloti. Planta 171: 289-301.
 51. Duncan, M. J. and Fraenkel, D. G. (1979). α -ketoglutarate dehydrogenase mutant of Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 137: 415-419.
 52. Earl, C. D., Ronson, C. W. and Ausubel, F. M. (1987). Genetic and structural analysis of the Rhizobium meliloti fixA, fixB, fixC and fixX genes. J. Bacteriol. 169: 1127-1136.
 53. Ebeling, S., Hahn, M., Fischer, H. M. and Hennecke, H. (1987). Identification of nifE, nifN and nifS like genes in Bradyrhizobium japonicum. Mol. Gen. Genet. 207: 503-511.
 54. Elkan H. G. (1984). Taxonomy and metabolism of Rhizobium and its genetic relationship. In: Biological Nitrogen Fixation (Ecology, Technology and Physiology). Ed. Martin Alexander. Plenum Publication Corporation. p. 1-38.
 55. Elliot, E. T. and Coleman, D. C. (1977). Soil protozoan dynamics in a shortgrass prairie. Soil Biol. Biochem. 9: 113-115.
 56. Emerich, D. W., Lepo, J. E. and Evans, H. J. (1983). Nodule

- metabolism. In: Nitrogen fixation. Vol. 3. Legumes. Ed. W. J. Broughton, Clarendon Press, Oxford. p. 213-244.
57. Espín, G., Moreno, S., Wild, M., Meza, R. and Iaccarino, M. (1990). A previously unrecognised glutamine synthetase expressed in Klebsiella pneumoniae from the glnT locus of Rhizobium leguminosarum. Mol. Gen. Genet. 223: 513-516.
 58. Fenchel T. and Blackburn T. H. Editores. (1979). Bacteria and mineral cycling, Academic Press, London, G.B. Chap. 5.
 59. Figurski D. H. and Helinski D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK12 dependent of a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1648-1652.
 60. Finan, T. M., Wood, J. M. and Jordan, D. C. (1983). Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Bacteriol. 154: 1403-1413.
 61. Fisher, R. F., Tu, J. K. and Long, S. R. (1985). Conserved nodulation genes in R. meliloti and R. trifolii. App. Environ. Microbiol. 49: 1432-1435.
 62. Fitzmaurice, A. M. and O'Gara, F. (1988). Involvement of glutamate as a carbon source in supporting nitrogen fixation activity in R. meliloti. In Nitrogen fixation: Hundred years after. Ed. H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton. Gustav Fischer Stuttgart, New York USA. p. 558.
 63. Friedman, A. M., S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema and F. M. Ausubel. (1982). Construction of a broad host range cosmid vector and its use in the genetic analysis of Rhizobium mutants. Gene 18: 289-296.
 64. Gallon, J. R. (1981). The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. Tren. Biol. Scie. 6: 19-25.
 65. Gardiol, M. J., Arias, A., Cervansky, C. and Martínez-Drets, G. (1982). Succinate dehydrogenase mutant of Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 151: 1621-1623.
 66. Giles-Gonzales, M. A., Ditta, G. S. and Helinski, D. R. (1991). A hemoprotein with kinase activity encode by the oxygen sensor of Rhizobium meliloti. Nature. 350: 170-172.
 67. Glenn, A. R., McKay, I. A., Arwas, R. and Dilworth, M. J. (1984). Sugar metabolism and symbiotic properties of carbohydrate mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 130: 239-245.

68. Gray, J. X. and B. G. Rolfe (1990). Exopolysaccharide production in Rhizobium and its role in invasion. *Mol. Microbiol.* 4: 1425-1431.
69. Gronger, P., Manian, S. S., Reilander, H., O'Connel, M., Priefer, U. B. and Pühler, A. (1987). Organization and partial sequence of a DNA region of the Rhizobium leguminosarum symbiotic plasmid pRL6J1 containing the genes *fix ABC*, *nifA*, *nifB* and a novel open reading frame. *Nucleic Acids Res.* 15: 31-34.
70. Gussin, G. N., Ronson, C. W. and Ausubel, F. M. (1986). Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu. Rev. Genet.* 20: 567-584.
71. Gutschick, U. P. (1981). Evolved strategies in nitrogen acquisition by plants. *Am. Nat.* 118: 607-615.
72. Halverson, L. J. and Stacey (1986). Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.* 50: 193-198.
73. Hardy, R. W. F. and Havelka, U. D. (1976). Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Vol. 7. International Biology Programme Series. Ed. P. S. Nutman. Cambridge University Press, London. p. 421-439.
74. Horvath, B., Kondorosi, E., John, M., Schmidt, J., Török, I., Györgypal, Z., Barabas, I., Wlecke, U., Schell, J. and Kondorosi, A. (1986). Organization structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host specificity for alfalfa, *Cell* 46: 335-343.
75. Humbeck, C., and Werner, D., (1989). Delayed nodule development in a succinate transport mutant of Bradyrhizobium japonicum. *J. Plant Physiol.* 134: 276-283.
76. Innes, R. W., Kuempel, P. L., Plazinski, J., Canter-Cremes, H., Rolfe, B. G. and Djordjevic, M. A. (1985). Plant factors induce expression of nodulation and host-range genes in Rhizobium trifolii. *Mol. Gen. Genet.* 201: 426-432.
77. Kahn, M. L., Kraus, J. and Shatters, R. G. (1988). Bacterial catabolism of nitrogen containing compounds in symbiotic nitrogen fixation. In *Physiological limitations and genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation*. Ed. F. O'Gara, S. Manian y J. J. Drevon. Kluwer Academic Publishers. p. 21-27.
78. Kahn, D. H., Kraus, J. and Somerville, J. E. (1983). A model for nutrient exchange in the Rhizobium-legume symbiosis. In *Nitrogen fixation Research Progress*. Ed. H. J. Evans, P. J. Bottomley y W. J. Newton. Martinus Nijhoff, Dordrecht. p.

193-199.

79. Knauf, V. and Nester W. (1982). Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. Plasmid 8: 45-54.
80. Kondorosi, E., Banfalvi, Z. and Kondorosi, K. (1984). Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: Identification of nodulation genes. Mol. Gen. Genet. 193: 445-452.
81. Kondorosi, A. (1991). Overview on genetics of nodule induction by *Rhizobium meliloti*. In: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Vol. 1. Ed. H. Hennecke and D.P.S. Verma. Kluwer Academic Publishers, p. 111-118.
82. Kossiak, R. M., Bookland R., Barkei, J., Paaren, H. E. and Applebaum, E. R. (1987). Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from glycine max. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7428-7432.
83. Lehninger A. L. (1982). Principles of Biochemistry. Worth Publisher, Inc. New York. U.S.A. p. 335-336.
84. Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé and J. Denarié. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligo-saccharide signal. Nature, 344: 781-784.
85. Libbenga, K. R. and Harkes, P. A. A. (1973). Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum*. Planta 114: 17-28.
86. Long, S. (1989). *Rhizobium* genetics. Annu. Rev. Gen. 23: 438-506.
87. Long, S. R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. Cell 56: 203-214.
88. Lowendorf, H. S. (1980). Factors affecting survival of *Rhizobium* in soils. In: Advances in Microbial Ecology. Ed. M. Alexander. Plenum Publishing Corp. New York. p. 87-123.
89. Lowry D., Rosenbrough N. and Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 251.
90. Lynch, J. M. (1976). Products of soil microorganisms in relation to plant growth. Crit. Rev. Microbiol. 5: 67-75.
91. Maniatis, T., Sambrook M. and E. F. Fritsch (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor

Laboratory Press. Vol. 1, 2, 3. p. 1.9-1.10, 9.49.

92. Martínez, E., D. Romero and R. Palacios. (1990). The Rhizobium genome. Crit. Rev. Plant Sci. 9: 59-93.
93. Martínez-Romero E., Segovia L., Martinus F., Franco A., Graham P. and Pardo M. A., 1990. Rhizobium tropici, a novel species nodulating Phaseolus vulgaris L. Beans and Leucaena spp. Tress International. J. Sistem. Bacteriol. 41: 417-426.
94. Marvel, D. J., Kuldau, G., Hirsch, A., Richards, E., Torrey, J. G. and Ausubel, F. M. (1985). Conservation of nodulation genes between Rhizobium meliloti and slow-growing Rhizobium strain that nodulates a nonlegume host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5841-5845.
95. McKay, I. A., Dilworth, M. J. and Glenn, A. R. (1989). Carbon catabolism in continuous culture and bacteroids of Rhizobium leguminosarum MNF 3841. Arch. Microbiol. 152: 606-610.
96. Merrick, M. J. (1983). Nitrogen control of the nif regulon in Klebsiella pneumoniae: involvement of the ntrA gene and analogies between ntrC and nifA. EMBO. J. 2: 39-45.
97. Merrick, M. J. (1985). Prospects for the transfer of nitrogen fixation genes to crop plants. AFC. Unit of nitrogen fixation. University of Sussex. p. 202-207.
98. Merrick, M. J. (1988). Nitrogen regulation of nitrogen fixation. In: Nitrogen source control of microbial processes. Ed. S. Sánchez-Esquivel. CRC Press Inc. p. 170-193.
99. Miller J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. USA.
100. Mora, J., J. Calderón, and G. Hernández. (1988). Search, assimilation and turnover of nitrogen in some fungi. In: Nitrogen source control of microbial processes. Ed. S. Sánchez-Esquivel. CRC Press, Inc. p. 59.
101. Mora, J. and F. Lara. (1988). Nitrogen metabolism: an overview. In: Nitrogen source control of microbial processes. Ed. S. Sánchez-Esquivel. CRC Press, Inc. p. 1-20.
102. Mortenson, L. E. and Thornely, R. M. F. (1979). Structure and function of nitrogenase. Annu. Rev. Biochem., 48, 387-418.
103. Nap, J. P. and T. Bisseling (1990). Developmental biology of a Plant-prokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science 250: 948-954.
104. Newcomb, W. (1981). Nodule morphogenesis. In: International

review of cytology, Supplement 13. Ed. G. H. Bourne y J. F. Danielli. New York: Academic Press, p. 246-298.

105. Noel K. D., Sánchez A., Fernández L., Leemans J., and Cevallos, M. A. (1984). Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158: 148-155.
106. Peralta, H., Du Pont, G. and Calderón, J. Obtention and characterization of Rhizobium meliloti mutant that lack the three glutamine synthetase activities. Sometido para su publicación.
107. Peters, N. K., Frost, J. W. and Long, S. R. (1986). A plant flavone luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti nodulation genes. Science 233: 917-1008.
108. Peters, N. K. and Long, S. R. (1988). Rhizobium meliloti nodulation gene inducers and inhibitors. Plant Physiol. 88: 396-400.
109. Poche, R, Lerouge, P., Prome, J. C., Faucher, C., Vasse, J., Maillet, F., Camut, S., De Billy, F., Denarie, J., and Truchet, G. (1990). NodRm-1 a sulphated lipo-oligosaccharide signal of Rhizobium meliloti elicits hair deformation, corticall cell division and nodule organogenesis on alfalfa roots. In: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Ed. H. Henneke and D.P.S. Verma. Kluwer Academic Publishers p. 119-126.
110. Rastogi, U. K. and Watson, R. J. (1991). Aspartate aminotransferase activity is required for aspartate catabolism and symbiotic nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 173: 2879-2887.
111. Rawsthorne, S., Minchin, F. R., Summerfield, R. J., Cookson, C. and Coombs, J. (1980). Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. Phytochem. 20: 341-355.
112. Redmond, J. W, Batley, M., Djordjevic, M. A., Innes, R. W., Kuempel, P. L. and Rolfe, B. G. (1986). Flavones induce expression of nodulation genes in Rhizobium. Nature 323: 632-634.
113. Rigby, P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113: 237-251.
114. Roberts, G. P. and Brill, W. J. (1980). Gene-product relationship of the nif regulon of Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol. 144: 210-217.

115. Robertson, J. G., Lyttleton, P., Bullivant, S. and Graystone, G. F. (1978). Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J. Cell Sci.* 30: 129-149.
116. Roche, P., P. Lerouge, J. C. Promé, C. Faucher, J. Vasse, F. Maillet, S. Camut, F. de Billy, J. Dénarié and G. Truchet. (1991). NodRm, a sulphated lipo-oligosaccharide signal of Rhizobium meliloti elicits hair deformation, cortical cell division and nodule organogenesis on alfalfa roots. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. Ed. H. Hennecke and D.P.S. Verma. Kluwer Academic Publishers. p. 119-126.
117. Rolfe, B. G. and P. M. Gresshoff (1988) Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39: 297-319.
118. Ronson, C. W., Lyttleton, P. L. and Robertson, J. G. (1981). C-dicarboxylate transport mutants of Rhizobium trifolii form ineffective nodules on Trifolium repens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4284-4288.
119. Ronson, C. W. and Primrose, S. B. (1979). Carbohydrate metabolism in Rhizobium trifolii: identification and symbiotic properties of mutants. *J. Gen. Microbiol.* 112: 77-88.
120. Rossen, L., Johnston, A. W. B. and Downie, J. A. (1984). DNA sequence of the Rhizobium leguminosarum nodulation genes nodAB and C required for root hair curling. *Nuc. Acids Res.* 12: 9497-9508.
121. Rossen, L., Shearman, C. A., Johnston, A. W. B. and Downie, J. A. (1985). The nodD induction gene of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the nod A, B, C genes. *EMBO J.* 4: 3369-3373.
122. Ruvkun, G. B. and Ausubel, F. M. (1980). Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 17: 191-198.
123. Salminen, S. O. and Streeter, J. G. (1987). Involvement of glutamate in respiratory metabolism of Bradyrhizobium japonicum bacteroids. *J. Bacteriol.* 169: 495-499.
124. Schetgens, R. M. P., Hontelez, J. G. J., van des Bos, R. C. and van Kammen, A. (1987). Identification and phenotypical characterization of a cluster of fix genes, including a nif regulatory gene, from Rhizobium leguminosarum. *Mol. Gen. Genet.* 200: 368-374.

125. Segovia, L., Young, P. and Martínez-Romero E. (1993). Reclassification of American Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli type I strains as Rhizobium etli sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 374-377.
126. Simon, R. (1984). High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. Mol. Gen. Genet. 196: 413-420.
127. Somerville, J. E. and Kahn, M. L. (1983). Cloning of the glutamine synthetase I gene from Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 156: 168-176.
128. Somerville, J. E., Shatters, R. G. and Kahn, M. (1989). Isolation characterization and complementation of Rhizobium meliloti 104A14 mutant that lack glutamine synthetase II activity. J. Bacteriol. 171: 5079-5086.
129. Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-518.
130. Sprent, J. I. (1986). Benefits of Rhizobium to agriculture. Trends in Biotechnol. 3: 124-129.
131. Sprent, J. I. (1987). The ecology of the nitrogen cycle. Cambridge University Press, England. p.151-155.
132. Stewart, W. D. P. (1982). Nitrogen fixation-its current relevance and future potential. Israel J. Bot. 31: 5-44.
133. Stout, J. D. and Heal, O. W. (1967). Protozoa. In: Soil Biology. Ed. Burges, A. and Raw, F. Academic Press, New York p. 149-152.
134. Stowers, M. D. (1985). Carbon metabolism in Rhizobium species. Annu. Rev. Microbiol. 39: 89-61.
135. Sundaresan, V., Jones, J. D. G., Ow, D. W. and Ausubel, F. M. (1983). Klebsiella pneumoniae nifa product activates the Rhizobium meliloti nitrogenase promoter. Nature 301: 728-731.
136. Surin, B. P., and Downie, J. A. (1988). Characterization of the Rhizobium leguminosarum gene nodLMN involved in efficient host specific nodulation. Mol. Microbiol. 2: 173-183.
137. Sutton, W. D., Pankhurst, C. E. and Craig, A. S. (1981). The Rhizobium bacteroid state. In International review of cytology, Supplement 13. Ed. G.H. Bourne and J. F. Danielli, New York Academic Press, p. 149-177.
138. Szeto, W. W., Nixon, B. T., Ronson, C. W. and Ausubel, F. M.

- (1987). Identification and characterization of Rhizobium meliloti ntrC gene: R. meliloti has separate regulatory pathway for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cell. J. Bacteriol. 168: 1423-1431.
139. Thony, B., Fischer, H. M. Anthematen, D., Bruderer, T. Hennecken, H. (1987). The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (fixR nifA) of Bradyrhizobium japonicum is expressed aerobically and is subject to a novel, nifA-independent type of activation. Nu. Acids Res. 15: 8479-8484.
140. Triplett, E. W. (1990). The molecular genetics of nodulation competitiveness in rhizobium and Bradyrhizobium. Mol. Plant-Microbe Interact. 3: 199-206.
141. Verma, D., and Long, S. (1982). The molecular biology of Rhizobium - legume symbiosis. Inter. Rev. Citol. 14: 211-244.
142. Verma, D., and Long, S. (1983). Molecular biology of Rhizobium plant symbiosis. In: Intracellular symbiosis. Ed. K. Jeon. New York: Academic Press. p. 211-245.
143. Wyman, M., Gregory, R. P. F. and Carr, N. G. (1985). Novel role for phycoerythrin in a marine cyanobacterium, Synechococcus strain DC2. Science 230: 818-825.
144. Yao, P. Y. and Vincent, J. M. (1969). Host specificity in the root hair "curling factor" of Rhizobium sp. Aust. J. Biol. Sci. 22: 413-423.
145. Zaat, S. A. J., Wijffelman, C. A., Spaink, H. P., Van Brussel, A. A. N., Okker, R. J. H. and Lugtenberg, G. J. J. (1987). Induction of the nodA promoter of Rhizobium leguminosarum sym plasmid PRL1J1 by plant flavonones and flavones. J. Bacteriol. 16:198-204.