

37
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno

ANALISIS FISICO Y FUNCIONAL DE UN
REARREGLO EN EL PLASMIDO SIMBIO-
TICO DE *RHIZOBIUM ETLI* CFN42 QUE
ALTERA COMPETITIVIDAD

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

Adriana de la Concepción Corvera Poiré



FACULTAD DE CIENCIAS
REGISTRACION ESCOLAR

México, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Adriana de la Concepción Corvera Poire

con número de cuenta 9052170-2 con el Título:

"Análisis físico y funcional de un rearreglo en el plásmido simbiótico de Rhizobium etli CFN42 que altera competitividad"

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	David René	Romero Camarena	
Director de Tesis Dr.	René	Cárdenas Vázquez	
M. en C.	Luisa	Alba Lois	
M. en C.	Víctor Manuel Valdés López		
Suplente BIOL.	Carlos	Castillo Pompeyo	
Suplente			

A mis papás, a mis hermanos y a Betito.

Agradecimientos.

Gracias a la UNAM por su infinita generosidad, en especial al CIFN por todo el apoyo que me ha prestado. Gracias a David por su amistad, por toda su ayuda y paciencia durante la realización de esta tesis. Gracias también a Javier y a Toño por ayudarme a aprender diversas técnicas.

Mucho agradezco a Jaime Mora y a César Rodríguez por revisar el manuscrito previo, y a todos aquellos que hicieron valiosos comentarios para mejorar mi trabajo. Gracias también a quienes han contestado mis preguntas y me han impulsado a seguir cuestionándome.

Gracias a quienes mantienen el material y el lugar donde trabajo limpios.

Mi mayor agradecimiento a todos aquellos que con su saludo diario han hecho mi vida más agradable.

Índice:

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Objetivos.....	15
Material y Métodos.....	16
Resultados.....	30
Discusión.....	41
Perspectivas.....	48
Conclusiones.....	50
Figuras.....	52
Apéndice.....	71
Literatura Citada.....	75

Resumen:

Se estudió un rearrreglo en el plásmido simbiótico (*OpSym*) de *Rhizobium etli* CFN42, generado por recombinación entre una región *nod-nif* de 170 Kb de este plásmido y un plásmido endógeno *pA*, lo que llevó a la pérdida de una región de 220 Kb del *pSym* original. Este rearrreglo provoca que la cepa que lo porta (CFNX250) muestre un fuerte descenso en su competitividad para la nodulación (i.e. CFNX250 coinoculada con CFN42 en una relación 1:1 ocupa únicamente un 10% de los nódulos) y un cambio en la producción de factores de nodulación.

Se mapearon los límites de la región del *pSym* contenidos en el plásmido rearrreglado (*pGM1*) y se encontró que la región conservada incluye desde las bandas 82 ú 83 hasta la banda 27 del plásmido simbiótico original (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) y que, posiblemente, la cointegración con *pA* fue en la región de la banda 83.

Los cambios en la competitividad y la producción de factores de nodulación de la cepa con el rearrreglo, sugieren que en la región de 220 Kb perdida durante la formación de *pGM1* existen determinantes genéticos involucrados en la competitividad y la producción de factores de nodulación tipo silvestre. Para identificar estos determinantes, se hicieron experimentos con cepas complementadas con diferentes regiones y/o cósmidos del *pSym* original. Estas cepas fueron probadas para ocupación de nódulos en *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa y para producción de factores de nodulación. Los resultados obtenidos muestran que la

región del p *Sym* correspondiente al cósmido 45 (que lleva desde la banda 24 hasta la 30) es capaz de complementar, al menos parcialmente, para la competitividad en la nodulación y que la región correspondiente al cósmido 7 (que abarca las bandas 80 a 3) es capaz de complementar para el patrón silvestre de producción de factores de nodulación. La región del cósmido 7 no parece estar involucrada en el fenotipo de competitividad.

Se observó también que los cambios en la competitividad y la producción de factores de nodulación entre CFN42 y CFNX250 no provocan diferencias en sus cinéticas de nodulación.

Paralelamente, se observó que una amplificación de 120 Kb en pGM1 restaura totalmente el fenotipo de competitividad silvestre, posiblemente por un efecto epistático.

Introducción.

Para que la vida se conserve, es necesario un reciclaje continuo de materia inorgánica y orgánica para producir sustratos que requieren nuevos organismos para vivir. El reciclaje continuo de nutrientes se lleva a cabo en forma conjunta por plantas, animales, microorganismos, reacciones físicas y químicas (Campbell, 1987).

Por lo general, para facilitar el estudio de los diversos compuestos necesarios para la vida, se estudian sus ciclos por separado; aunque en cuanto a naturaleza sean inseparables. Por ejemplo, los ciclos del carbono, del nitrógeno y del agua están relacionados y son interdependientes entre sí ya que tienen en común la materia orgánica: carbono, nitrógeno y agua se combinan en el protoplasma (Campbell, 1987). En este trabajo nos enfocaremos directamente al ciclo del nitrógeno.

El nitrógeno es uno de los elementos esenciales para la vida (Sprent & Sprent, 1990), es un componente indispensable para todas las células, constituyendo del 1 al 10% del peso de plantas y del 20 al 30% del peso de animales (Campbell, 1987).

Como parte importante del ciclo del nitrógeno se encuentra la descomposición de materia orgánica. Aunque el nitrógeno se encuentra en pequeñas cantidades durante la descomposición (los residuos de plantas y proteínas animales tienen aproximadamente una proporción de C/N de 30:1 y 5:1, respectivamente), la mayor parte del nitrógeno utilizado por las plantas en medios naturales proviene de la mineralización de la materia orgánica existente (Campbell, 1987).

En el ciclo del nitrógeno (Fig. 1), los diversos procesos son controlados en gran medida por la aereación; del equilibrio entre estos procesos depende la cantidad de nitrógeno disponible en un ecosistema (Campbell, 1987). Los principales procesos o conversiones químicas que se llevan a cabo en el ciclo del nitrógeno son:

1)Nitrificación.- Conversión de amonio (resultado de la descomposición de materia orgánica nitrogenada) a nitrato. Se lleva a cabo por acción de diversos microorganismos (Campbell, 1987).

2)Reducción de nitrato.- Es la reducción de nitrato a nitrito y luego a amonio por bacterias, hongos y cianofitas en condiciones aeróbicas (Campbell, 1987).

3)Desnitrificación.- Conversión de nitrato a nitrito y después a óxido nitroso o nitrógeno que se libera en forma de gas a la atmósfera. Este proceso se lleva a cabo principalmente por microorganismos anaerobios facultativos que utilizan el nitrato como aceptor último de electrones en ausencia de oxígeno (Campbell, 1987).

4)Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN).-Es la reducción de nitrógeno molecular a amonio, llevada a cabo exclusivamente por algunos procarlotes (bacterias y cianofitas) (Campbell, 1987; Sprent & Sprent, 1990).

Es este último proceso, el de la fijación biológica del nitrógeno, el que se relaciona directamente con nuestro trabajo por ser el proceso por el cual entra mayor cantidad de nitrógeno al ciclo.

El flujo terrestre de nitrógeno a partir de la FBN se ha calculado dentro de un rango de 139 a $170 \cdot 10^6$ ton N/año (Peoples & Craswell, 1992). El aporte de nitróge-

no por el proceso de FBN a un ecosistema puede derivar de la actividad de organismos autótrofos ó heterótrofos, aerobios ó anaerobios, y de vida libre ó simbiotes (Campbell, 1987; Peoples & Craswell, 1992). Se ha calculado que la contribución relativa de nitrógeno fijado biológicamente es de un 70% por parte de los sistemas simbióticos y de un 30% por los no-simbióticos (Peoples & Craswell, 1992); aunque los estimados varían grandemente. Así, podemos ver que las asociaciones simbióticas son una fuente de nitrógeno fijado más importante que la de cualquier sistema de vida libre (Campbell, 1987). Es por esto que nos enfocaremos al estudio de relaciones simbióticas específicas.

Las asociaciones simbióticas, fuente de nitrógeno fijado biológicamente, son diversas (Peoples & Craswell, 1992); entre ellas podemos mencionar asociaciones como:

-Asociaciones actinorrhizas. Por ejemplo: *Casuarina /Frankia*.

-Asociaciones con cianofitas. Por ejemplo: *Azolla /Anabaena*, *Cícadras/Nostoc* y líquenes.

-Asociaciones entre leguminosas y Rhizobaceas. Por ejemplo: *Phaseolus vulgaris / Rhizobium etli*.

De entre los organismos fijadores de nitrógeno, aquellas bacterias que requieren entrar en una relación simbiótica con una planta leguminosa, para poder iniciar esta vía metabólica, son de principal interés para nosotros.

El resultado de esta simbiosis es la formación de nódulos (en base a tejidos de la planta huésped y con bacteroides en su interior; Fig. 2) donde los bacteroides son capaces de fijar nitrógeno gracias a una serie de condiciones ambientales y gracias

a la interacción misma planta-bacteria (Sprent & Sprent, 1990). La FBN es posible gracias a la acción del complejo enzimático de la nitrogenasa (Sprent & Sprent, 1990), sistema enzimático que requiere hierro, molibdeno y azufre (Yates, 1992), y de concentraciones bajas de oxígeno en su medio (Campbell, 1987; Long, 1989; Yates, 1992).

La eficiencia en la nodulación, por cepas utilizadas como inoculantes en el campo, se ha convertido en un problema económico (Triplett & Sadowsky, 1992), ya que la asociación simbiótica leguminosa/Rhizobaceae contribuye a incrementar la fertilidad del suelo y la producción agrícola (Araujo, et al., 1994). Cuando se utilizan inóculos de Rhizobaceas en un cultivo agrícola, se presume que una asociación simbiótica fijadora de nitrógeno es capaz de satisfacer sus necesidades de nitrógeno a partir del N_2 atmosférico, y que el nitrógeno fijado excedente se acumula en el suelo beneficiando a éste y otros cultivos (Peoples & Craswell, 1992).

El uso de fertilizantes químicos, se ha convertido en los últimos años en una herramienta indispensable en la práctica de la agricultura (Bohlool et al., 1992); sin embargo, su uso indiscriminado contribuye generosamente a la contaminación ambiental y a la erosión de los suelos (Peoples & Craswell, 1992). Es así como la FBN es una alternativa importante al uso de fertilizantes nitrogenados que tienen un alto costo económico y ambiental. Los sistemas de fijación biológica de nitrógeno aplicados a la agricultura permiten reducir la necesidad de un aporte externo de nitrógeno y prometen un mejoramiento de los recursos internos de plantas, bacterias y suelos (Bohlool et al., 1992).

A pesar de la evidente importancia de la fijación biológica del nitrógeno, aún es poco lo que se sabe sobre las respuestas de los organismos a ciertas condiciones dadas, sobre cómo interaccionan los organismos fijadores de nitrógeno con el medio, etc. (Bohlool et.al.,1992). Una de las barreras más importantes para incrementar la FBN en medios agrícolas, es la competencia por la nodulación entre las cepas utilizadas como inóculo y las cepas nativas del suelo, ya que estas últimas frecuentemente ocupan la mayoría de los nódulos formados (Triplett & Sadowsky, 1992; Araujo et.al., 1994). Esta competencia por la nodulación es el principal problema que discutiremos en este trabajo y será definida un poco más adelante.

Diversos géneros de bacterias de la familia Rhizobiaceae nodulan leguminosas: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. (Fisher & Long, 1992). Las especies pertenecientes a estos géneros son algunas veces de un amplio rango de huésped, es decir, nodulan distintas especies de plantas (por ejemplo: *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* nodula raíces de plantas de chícharo y arveja), y algunas otras veces son de un rango estrecho (por ejemplo: *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* nodula raíces de la planta de trébol; Martínez-Romero & Rosenblueth, 1990; Long, 1989; Fisher & Long,1992). En el presente estudio, nos enfocaremos a bacterias con un estrecho rango de huésped, que nodulan plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), son productoras de melanina, y tienen copias funcionales múltiples (Quinto et.al., 1985; Romero et.al. 1988) de los genes estructurales de la nitrogenasa y sus genes *nodA* y *nodBC* separados: bacterias de la especie *Rhizobium etli* (Segovia et.al.,1993). CFN42 es la cepa tipo de esta especie, contiene seis plásmidos (pA a pF) cuyo tamaño varía entre las 150 y las 600 Kb; pG ha sido designado como el plásmido simbiótico (pSym) (Figs. 5a y 6).

Para que una bacteria pueda nodular una planta, debe ser capaz de sobrevivir en su medio (en la rizósfera) y de detectar la presencia de la planta e infectarla antes que ninguna otra. La detección e infección de una planta requiere de un complejo intercambio de señales coordinadas entre la bacteria y la planta misma (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1991; Fisher & Long, 1992): La planta huésped libera a la rizósfera sustancias que funcionan como quimioattractores y compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides que estimulan la expresión coordinada de genes bacterianos necesarios para la nodulación (genes *nod*). La bacteria, en cambio, sintetiza oligómeros de N-acetil glucosamina (factores de nodulación) que causan cambios morfológicos en la raíz de la planta para comenzar la infección (Fig. 2). Los flavonoides secretados por distintas plantas presentan diversas modificaciones en sus esqueletos o en sus grupos laterales; de igual manera, los factores de nodulación pueden presentar sustituciones huésped-específicas (Fisher & Long, 1992).

Así, diferentes cepas compiten entre sí a diferentes niveles: en la rizósfera y en la formación de nódulos (Wolff et.al., 1991). Primeramente, existe una competencia por la supervivencia y la reproducción en la rizósfera, ya que se enfrentan a factores de estrés como: tipo de suelo, nutrientes, metales pesados, pH, temperatura, salinidad y humedad; se enfrentan además a ataques de bacteriófagos, parásitos (como *Bdellovibrio*) y protozoarios depredadores (Dowling & Broughton, 1986; Streit et.al., 1992; Wolff et.al., 1991).

Cuando una cepa ha sido exitosa en su competencia por la supervivencia en la rizósfera debe entonces competir por la infección de la planta. Para lograr la infección, debe enfrentarse a otras bacterias no fijadoras, a micorrizas y a otras bacte-

rias que también compiten por la infección de la planta (Streit et.al., 1992; Dowling & Broughton, 1986; Wolff et.al. 1991).

A partir de este momento, hablaremos de competitividad como la habilidad de una cepa de dominar la nodulación (Soto et.al.,1993); como una relación entre la proporción de cada cepa en el inóculo y la proporción de nódulos ocupados por estas cepas (Beattie & Handelsman, 1993; Araujo et.al., 1994) y, como dijimos antes, enfocaremos nuestro trabajo a este problema.

En los estudios de competitividad, la cinética de nodulación es un aspecto importante a considerar debido a que una cepa que tiene un retraso en ésta (en la velocidad de nodulación) es considerada no competitiva (Triplett & Sadowsky, 1992). La cinética de nodulación puede verse afectada por aspectos múltiples de la interacción planta-*Rhizobium*, como:

- a) Quimiotaxis de la bacteria a los exudados de la raíz (Martínez et.al, 1990)
- b) Concentración de flavonas en la rizósfera (Kapulnik et.al., 1987).
- c) Nivel de expresión de los diferentes genes *nod* en respuesta a exudados radiculares (Fisher & Long, 1992; Martínez et.al., 1990; Vázquez et.al. 1993; Davis & Johnston, 1990a y 1990b).
- d) Concentración y tipo de los factores Nod producidos por la bacteria (Inductores de diversos cambios en la planta como la deformación, ramificación y enroscamiento de los pelos radiculares, y la organogénesis de los nódulos (Fisher & Long, 1992; Poupot et.al., 1993).

e) Motilidad y capacidad de adhesión a la superficie radicular (Triplett & Sadowsky, 1992; Dowling & Broughton, 1986)

f) Respuesta autorregulatoria de la planta (Triplett & Sadowsky, 1992).

Mutaciones en los genes *nod* comunes (*nodABC*) afectan la competitividad en forma directa ya que la cepa no puede inducir nodulación o presenta un retraso en ella (Triplett & Sadowsky, 1992; Vázquez et.al., 1991).

Adicionalmente a los factores relacionados con la cinética de nodulación, se han descrito y aislado otros genes involucrados en competencia: genes de producción y resistencia a trifolitoxinas (Triplett, 1990) y genes *nfe* (Sanjuan & Olivares, 1989).

Triplett (1990) estudió la producción de trifolitoxinas por parte de algunas cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y aisló sus genes; él encontró que, en experimentos de competitividad, la producción de trifolitoxinas incrementa la proporción de nódulos ocupados por la cepa productora de dicha bacteriocina. Por esta razón, se considera que la producción de bacteriocinas es un factor limitante para la competitividad de una cepa con respecto a otra.

Los genes *nfe* (eficiencia en la formación de nódulos) han sido descritos como genes, pertenecientes a una región de un plásmido críptico de *Rhizobium meliloti*, relacionados con el incremento en la nodulación (Toro & Olivares, 1986; Sanjuan & Olivares, 1989), activados por el sistema regulatorio de NifA-NtrA (Sanjuan & Olivares, 1989, 1991a y 1991b; Soto et.al., 1993); sin embargo, estos genes no han sido encon-

trados en otras cepas de la misma especie en experimentos de hibridación (Sanjuan & Olivares, 1991b).

Además de los genes *nfe* presentes en un plásmido críptico, se ha comprobado que son diversos los plásmidos involucrados en la competitividad de una cepa determinada (Brom et.al., 1992; Martínez-Romero & Rosenblueth, 1990). Sin embargo, el plásmido simbiótico es de especial importancia para nosotros dado que es portador de la mayoría de las copias de los genes indispensables para la nodulación y la fijación del nitrógeno (genes *nod*, *nif*, *fix*, etc.) y se ha demostrado que puede tener gran influencia en la competitividad (Brewin et.al. 1983).

Son diversos los estudios donde se ha intentado probar y/o incrementar la competitividad de una cepa, de entre ellos destaca el trabajo de Beattie & Handelsman (1993) donde se sugiere que cambios genéticos espontáneos incrementan la competitividad de una cepa.

A pesar de la evidente importancia de conocer y entender los factores genéticos involucrados en la competencia, es aún escaso el número de genes descritos que influyen en este proceso. Esta situación se debe a que el problema de competencia incluye factores relacionados con la bacteria misma, la planta y el medio, que son difíciles de regular (Dowling & Broughton, 1986). Otro factor limitante en el conocimiento del conjunto completo de los genes de *Rhizobium* específicos para la simbiosis, dentro de los que están incluidos los genes para competencia, es la sobresimplificación que se hace comunmente a nivel experimental para estudiar la nodulación. La mayor parte de los genes simbióticos que se conocen han sido descri-

tos bajo condiciones estrictas de laboratorio, con plantas creciendo en situaciones subóptimas y utilizando inóculos con un solo tipo de bacteria. Así, mientras se utilicen condiciones "más naturales" en los estudios, más secuencias simbióticas serán descubiertas, entre ellas, aquellas involucradas con la competitividad (Martínez et.al., 1990).

Este estudio se realizó de la manera más natural posible y se enfocó a algunos factores fisiológicos y genéticos (relacionados con la especificidad), y dejó a un lado los factores ecológicos de la competitividad. Se realizó en base al plásmido simbiótico de una cepa de *Rhizobium etli*, CFNX250 (derivada de CFN42), que tiene un plásmido simbiótico auto-transmisible, pGM1, que le confiere una alta capacidad de fijación de nitrógeno, pero una baja competitividad.

El plásmido pGM1 de la cepa CFNX250 se generó por recombinación entre el plásmido simbiótico original de la cepa DEM151 (pSym CFN42 con una fusión *lacZ* en la región de *nifH* a, Fig. 5b; Valderrama, 1993) y el plásmido A (pA) de la misma cepa. pGM1 es un cointegrado entre todo pA y una región de aproximadamente 170 Kb del pSym (bandas 82 ó 83 a 27; Figs.3 y 4. Romero, 1993; Eparvier, comunicación personal; este estudio).

Esta cepa, CFNX250, presenta la fusión en la región de *nifHa*, por lo que estos genes no son funcionales (las reiteraciones *nifHb* y *nifHc* siguen siendo funcionales). Sin embargo, hemos visto que esta cepa fija la misma cantidad de nitrógeno que la cepa CFN42 (silvestre); CFNX250 también ha perdido su capacidad de producir melanina (Romero, comunicación personal). El mayor problema que presenta esta ce-

pa es su baja competitividad; en experimentos de inoculación de plantas de frijol con CFN42 y CFNX250, en proporciones 1:1, se ha observado un 90% de ocupación de nódulos por parte de la cepa CFN42 y solamente un 10% por la CFNX250 (Eparvier, comunicación personal; este estudio).

Bajo la hipótesis de que esta cepa (CFNX250) ha perdido información genética que le es indispensable para competir, Agnès Eparvier (comunicación personal) construyó cepas con pGM1 y complementaciones de tres tipos, utilizando regiones del pSym CFN42 que se perdieron durante la formación del pGM1 (Fig.5):

- 1)pDEL270 (incluye desde la banda 26 hasta la 85; Fig. 5e).
- 2)pDEL217 (incluye desde la banda 28 ó 29 hasta la 80; Fig. 5f).
- 3)pDEL200 (incluye desde la banda 28 ó 29 hasta la 79; Fig. 5g).

pDEL200 y pDEL217 no complementan a la cepa CFNX250 para hacerla tan competitiva como la CFN42. Por el contrario, la pDEL270 sí logra una complementación parcial, esto es , que en experimentos de coinoculación CFN42 y CFNX252 (CFNX250+pDEL270; Tabla I), en proporción 1:1, el porcentaje de ocupación de nódulos es aproximadamente 70% y 30% respectivamente (Eparvier, comunicación personal; este estudio).

Los resultados obtenidos en los experimentos de competitividad entre CE3 y CFNX252 nos hicieron pensar que componentes genéticos que complementan para competitividad pueden encontrarse en la zona cercana a la región donde ocurrió el rearreglo, esto es entre las bandas 25 y 30, correspondientes al cósmido cGD 45 (colección de cósmidos de cepa CFN42, Fig.6a; Girard et.al., 1991), y/o entre las ban-

das 80 y 1, correspondientes al cósmido cGD 7 (Fig. 6a). Es por esto que Eparvier (comunicación personal) construyó cepas donde complementó a la cepa CFNX250 con un cósmido a la vez (colección de cósmidos: Fig. 6a) para proceder a hacer experimentos de competitividad.

Objetivos:

Objetivo general:

*Analizar física y funcionalmente a pGM1, producto de un rearrreglo del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* CFN42.

Objetivos particulares:

*Identificar las zonas de cointegración del plásmido Δ y las 170 Kb del plásmido simbiótico de CFN42 en la formación de pGM1.

*Identificar alguna(s) zona(s) génica(s) del plásmido simbiótico que contribuya(n) al incremento en la competitividad de una cepa.

Material y Métodos:

Cepas utilizadas:

Las cepas de *Rhizobium etli* utilizadas en la realización de este estudio, y algunas de sus características, se resumen en las tablas I y II.

Tabla I. Cepas de *Rhizobium etli* usadas en este estudio

CEPA	CARACTERISTICAS PLASMIDICAS (Fig.5)*	Referencia
CFN42	pSym CFN42, 390 Kb, silvestre.	Quinto et.al., 1982.
CE3	pSym CFN42, 390 Kb, silvestre.	Noel et.al., 1984.
DEM151	pSym con un cassette insertado en <i>nifHa</i> . Fusión transcripcional con <i>lac Z</i> que confiere resistencia a Km, Gm, Sp y Sm (pDEM151).	Valderrama, 1993.
CFNX24	pSym con una amplificación de la banda 80 hasta la 28 (aprox)	Romero, datos no publicados
CFNX250	pGM1 (cointegrado de pA y 170 Kb de pDEM151)	Romero, 1993
CFNX253	pGM1 con una duplicación <i>nif-nif</i> (pGM1 amp.)	Romero, datos no publicados
CFNX258	pGM1 con una triplicación <i>nif-nif</i>	Romero, datos no publicados
CFNX252	CFNX250 con un plásmido complementario a pGM1 que va de la banda 26 hasta la banda 85 (pDEL270)	Eparvier, datos no publicados
CFNX254	CFNX250 con un plásmido complementario a pGM1 que va de la banda 28 ó 29 hasta la banda 80 (pDEL217)	Eparvier, datos no publicados
CFNX255	CFNX250 con un plásmido complementario a pGM1 que va de la banda 28 ó 29 hasta la banda 79 fragmentada (pDEL200)	Eparvier, datos no publicados
CFNX273	CFNX250 con un vector que lleva el cGD 7	Eparvier, datos no publicados
CFNX278	CFNX250 con un vector que lleva el cGD 45	Eparvier, datos no publicados

*Todas las cepas tienen el mismo genotipo que su parental, CFN42, salvo por las especificaciones hechas en la tabla para cada una.

Tabla II. Algunas características fenotípicas de las cepas de *Rhizobium etli* utilizadas en este estudio

CEPA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE:	
	RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	PRODUCCION DE MELANINA
CFN42	Nal 20 µg/ml	Sí
CE3	Nal 20 µg/ml, Sm 200 µg/ml	Sí
DEM151	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	Sí
CFNX250	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	No
CFNX253	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	No
CFNX258	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	No
CFNX24	Nal 20 µg/ml, Km 50 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	Sí
CFNX252	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	Sí
CFNX254	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	Sí
CFNX255	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	Sí
CFNX273	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	No
	Tc 3 µg/ml, Neo 60 µg/ml.	
CFNX278	Nal 20 µg/ml, Km 15 µg/ml, Gm 30 µg/ml, Sp 100 µg/ml y Sm	No
	Tc 3 µg/ml, Neo 60 µg/ml.	

Condiciones de crecimiento de cepas de *Rhizobium etli* :

Las cepas de *Rhizobium etli* se crecieron a 30° C, en medio rico PY (peptona de caseína-extracto de levadura) que contiene 0.5% de peptona de caseína (Bioxon), 0.3% de extracto de levadura (Bioxon) y 10mM CaCl₂ (Noel et.al., 1984). Para medios sólidos se adicionó agar bacteriológico (Bioxon) 1.5%.

Extracción de DNA total de cepas de *Rhizobium* (modificado de Ausubel et.al., 1987):

Se inocularon 5 ml. de medio líquido PY con una asada abundante de la cepa y se incubaron entre 16 y 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron los cultivos durante 3 min, a una velocidad de 14000 RPM a temperatu-

ra ambiente, en tubos eppendorf. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla en 1 ml de amortiguador Tris (50 mM)-EDTA (20mM)- pH 8 [TE pH8(50/20)]. Se resuspendió nuevamente la pastilla en 0.4 ml de TE pH8(50/20). Se le agregaron 0.05 ml de una solución de pronasa (5 mg/ml) predigerida (1 hr a 37° C) diluída en TE pH8 (50/20) y 0.05 ml de una solución de SDS (al 10%) en TE pH8(50/20). La mezcla se incubó durante 1 hr a 37° C. Se le añadieron 500 µl de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24/24/1) saturado con TE pH8(10/1) y se centrifugó durante 10 min, a una temperatura de 4° C. Se extrajo la fase acuosa (la fase menos densa) y se recuperó en un tubo eppendorf nuevo. Se hicieron una segunda extracción como la anterior y dos extracciones más utilizando 500 µl de cloroformo frío.

Se precipitó el DNA al agregar a la mezcla 1/25 de su volumen de NaCl (5 M) y dos volúmenes de etanol absoluto frío llevándola a una temperatura de -70° C durante 1 hora. Se centrifugó y se lavó 3 veces la pastilla en etanol (70%) frío. Se secó la pastilla al vacío (en el evaporador Savant: Speed Vac SVC100) y se le agregaron 40 µl de una mezcla de 500 µl de TE pH8(10/1) y 10 µl de RNAasa. Nuestro DNA estaba listo para usarse.

Corte de DNA con enzimas de restricción:

Se hicieron cortes de DNAs totales de diversas cepas con la enzima de restricción *Bam* HI (5 u/µg de DNA) utilizando el amortiguador E6 (Amersham) al 10% en H₂O desionizada y siguiendo las especificaciones del proveedor (Amersham).

Geles verticales para transferencia:

Se corrieron muestras de los DNAs extraídos y digeridos con *Bam* HI, en geles verticales (1% agarosa en Tris Acetatos 1X, de 15 x 15 cm de superficie y 3 mm de espesor) durante aproximadamente 15 hrs a voltaje constante (30 volts). Bajo estas condiciones, el marcador de corrida (azul de bromofenol) queda a aproximadamente 1 cm de la base del gel.

"Southern Blot" (Ausubel et.al., 1989):

Transferencia de geles a filtros de nitrocelulosa :

Se cubrieron los geles con una solución de HCl 0.25 M, en estas condiciones se hicieron dos lavados de 15 min cada uno, después se hicieron dos lavados con una solución de NaOH 0.5 M + NaCl 1.5 M durante 15 min más (por lavado) y, por último se hicieron dos lavados en una solución de Tris 0.5 M + NaCl 1.5 M durante 30 min cada uno; manteniéndolos en agitación a 4° C.

Se colocó el gel entre dos filtros de nitrocelulosa Hybond-C Extra (Amersham), previamente hervidos durante 10 min y humedecidos en SSC 6X, esto se colocó entre 4 filtros Whatman (2 de cada lado) previamente humedecidos en SSC 6X y entre 16 capas de papel absorbente (8 de cada lado) y dos vidrios. Se colocó sobre el vidrio superior un frasco lleno de agua (de aproximadamente 1 Kg) y se dejó así durante 16 hrs.

Cuando hubo transcurrido el tiempo de transferencia, se marcaron los filtros de nitrocelulosa con un bolígrafo (carriles y número de gel) y se sumergieron en SSC

6X. Se dejaron secar durante media hora entre hojas de papel absorbente y, posteriormente, se metieron a secar en un horno al vacío durante 2 hrs, a 80° C y a una presión de vacío de 15 lb/in².

Los filtros estaban ya listos para la hibridización.

Prehibridización:

Los filtros de nitrocelulosa se prehibridizaron con 15 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, Denhardt al 10%, SSC 5X, agua desionizada estéril y DNA desnaturalizado de esperma de salmón (100 µg/ml) y manteniendo los tubos en rotación a 65° C al menos durante dos horas.

Marcaje de detectores por la técnica de "nick-translation":

Se hicieron mezclas de:

2 µl de DNA a utilizar como detector + 4 µl de deoxinucleótidos (dATP, dGTP, dTTP; cada uno en concentración final 25µM) + 2 µl de enzima (DNA polimerasa I) + 10 µl de H₂O desionizada + 2 µl [α^{32} P]-dCTP (proveedor de Kit para nick- translation y marca radiactiva: Amersham); las clonas de los detectores utilizados fueron proporcionadas por Ma. de Lourdes Girard (las subclonas de las bandas se encuentran en el vector pBR328; Girard et.al., 1991).

Se mantuvo la reacción a 14° C durante 2 hrs.

Purificación de detectores:

Se agregaron, a la mezcla de nick-translation, 280 μ l de buffer de columna (ver apéndice). Estos 300 μ l de muestra se pasaron por una columna de 1 ml de sephadex (Sephadex G-75, Sigma) seguidos por 600 μ l de buffer de columna. Los primeros 300 μ l de solución que salieron de la columna se desecharon, los siguientes 600 μ l se recolectaron en tubos eppendorf.

Para determinar si nuestros detectores habían incorporado la marca radiactiva, se tomaron 5 μ l de cada muestra y se determinó la cantidad de CPM en un "Probe Count" (Oncor).

Hibridización:

Los tubos de prehibridización se dejaron enfriar unos 10 min. Se desechó la solución de prehibridización y se les agregaron 8 ml de solución fresca + el detector correspondiente a cada uno (previamente desnaturalizado). Se mantuvieron los tubos (con los filtros y los detectores) a 65° C y en rotación aproximadamente por 16 hrs.

Lavado y Secado:

Se sacaron los tubos del horno y se desechó el líquido de hibridización, se enjuagó ligeramente la membrana con 30 ml (aproximadamente) de solución de SSC 2X + SDS 0.1% que se desechó también.

Se hizo un lavado de 15 min, a temperatura ambiente, en rotación, en una solución de SSC 2X + SDS 0.1%. Posteriormente, se hicieron tres lavados de 30 min

cada uno, a 55° C, en rotación, en una solución de SSC 0.1X + SDS 0.1% y un lavado de 15 min, bajo las mismas condiciones, en una solución de SSC 0.1X .

Se sacaron los filtros de los tubos y se secaron en el homo a 55° C durante 10 min.

Exposición:

Los filtros se colocaron en cassettes para exposición y se les puso un film (Kodak X-Omat K XK-1) a exponer (por tiempo variable). Los cassettes se mantuvieron a -70° C durante todo el tiempo de exposición.

Revelado de films (autorradiografías):

Se sacaron los films de los cassettes de exposición y se sumergieron en líquido revelador durante 40 seg, en agitación. Se sacó cada film del revelador y se sumergió durante 2 ó 3 segundos en agua. Se escurrió el exceso de agua y se sumergió en líquido fijador durante 40 seg más, manteniéndolo en agitación. Se enjuagó cada film bajo el chorro del agua y se colgó para secar.

Cinética de nodulación y Competitividad:

Preparación de macetas:

Utilizamos como macetas botes de plástico con tapa, con una capacidad de un litro. Se hizo una perforación en la base de cada maceta, se puso por dentro un cuadro de gasa del tamaño de la base misma y por fuera un trozo de papel aluminio con cinta adhesiva (para evitar que el agua drenara), se llenaron las macetas con ver-

miculita previamente lavada e hidratada con agua corriente y se taparon con tapas que previamente habían sido perforadas 5 veces haciendo la forma de una cruz. En la perforación central se colocó un tapón de hule. Se cubrieron con papel aluminio y se esterilizaron en autoclave durante 1.5 hrs.

Preparación de charolas para germinación de semillas:

Se lavó vermiculita y se hidrató con agua corriente, con ella se llenaron charolas de 7 cm de altura y se alisó su superficie. Las charolas ya llenas se cubrieron con dos capas de papel aluminio y se esterilizaron en autoclave durante 1.5 hrs.

Germinación de Semillas:

Se seleccionaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa) cuya testa se encontrara completa. Se hidrataron durante 10 min en agua corriente y se esterilizaron con etanol absoluto durante 1 min, se enjuagaron 5 veces con H₂O destilada estéril y se esterilizaron nuevamente en una solución diluída de blanqueador comercial (cloralex) al 20% durante 15 min, se lavaron con H₂O también destilada y estéril. Se desecharon, empleando pinzas estériles, aquellas semillas cuya testa se decoloró durante el tiempo de esterilización. Las semillas ya seleccionadas se sembraron con el hillo hacia abajo en las charolas de germinación y se dejaron durante 2 días en cuarto de cultivo a 29^o C para que germinaran.

Preparación de inóculos:

Se crecieron cepas hasta fase estacionaria durante toda la noche. A la mañana

siguiente se tomó una muestra de 1ml del cultivo, se lavó con H₂O estéril y se diluyó 10 veces. De esta dilución se midió su densidad óptica (absorbancia a $\lambda=600$ nm) y con ella se calculó el número aproximado de células por ml de cultivo.

Para los experimentos de cinética de nodulación donde el inóculo correspondería a una sola cepa, se calculó la dilución en agua necesaria para tener una concentración de $2.5 \cdot 10^7$ células/ml. Para los experimentos de competencia se calculó la dilución para tener una concentración de $5 \cdot 10^7$ células/ml, la mitad de la concentración aportada por cada una de las cepas para lograr una proporción de 1:1.

Montaje de experimentos de cinética de nodulación y competencia:

Los experimentos de cinética de nodulación se llevaron a cabo sembrando dos semillas germinadas por maceta, un total de 32 macetas por cepa, e inoculando cada una con 1 ml de inóculo bacteriano. Cada semilla se cubrió con arena estéril (para evitar contaminaciones) y las macetas fueron llevadas al invernadero.

Los experimentos de competitividad se montaron de forma similar que los de cinética de nodulación, pero sembrando cuatro semillas por maceta y utilizando los inóculos dobles sobre nuestras semillas de frijol

que también se cubrieron con arena y se mantuvieron bajo un régimen de invernadero.

En ambos casos, las plántulas fueron regadas a partir del día 9 ó 10 postinoculación con solución Norris modificada (ver apéndice), retirando previamente el papel aluminio de la base de la maceta para permitir que drenara el exceso de líquido. Para ambos experimentos se sembraron semillas que se dejaron sin inocular como controles y, para los experimentos de competitividad, se sembraron semillas y se inocularon con cada una de las cepas a competir para observar que cada una de ellas estuviera nodulando bien.

Para el experimento de cinética de nodulación se sacaron, a partir del día seis postinoculación, cuatro macetas diarias por cepa (es decir, 8 plantas por día y por cepa) hasta el día 10 postinoculación y luego cada segundo día hasta el día 16 postinoculación y se contaron los nódulos presentes en cada raíz.

Para los experimentos de competitividad se mantuvieron las plantas en crecimiento durante 18 días y posteriormente fueron cosechadas. Se aislaron nódulos de las raíces de cada planta, se esterilizaron superficial-

mente con cloralex al 20% durante 3 min. Se hicieron identificaciones de cepas aisladas de nódulo por cultivo en medios con antibiótico (inciso a) y/o por pruebas de producción de melanina (inciso b):

a) El contenido de 50 de estos nódulos se exprimió en cajas de Petri con PY y se estiraron para obtener colonias aisladas, se incubaron durante tres días a 30^o C. De las colonias aisladas se picaron, al azar, ocho de ellas (por nódulo) en cajas con PY y con PY+algún antibiótico, según el caso, y se incubaron durante dos días más a 30^o C. El número de colonias crecidas se contó para determinar porcentaje de ocupación de nódulos por cada una de las cepas en competencia y porcentaje de nódulos mezclados.

b) Se depositaron 50 nódulos por cada competencia en 100 µl de una solución de tirosina (50 µg/ml)+sulfato de cobre (20 µg/ml)+SDS (1%) y se picaron con un palillo para determinar producción de melanina. De acuerdo al número de nódulos con producción de melanina se determinó el porcentaje de ocupación de nódulos por cada una de las cepas en competencia.

Análisis estadístico:

Con los resultados obtenidos diariamente del experimento de cinética de nodulación, se calcularon la media y la desviación estándar, para cada uno de los tres tratamientos, y se construyó una gráfica de número de nódulos (media \pm D.S.) vs. tiempo (días) utilizando software "Sigmplot" para Macintosh.

Factores de nodulación (modificado de Lerouge et.al., 1990):

A partir de cultivos de cepas crecidas durante 16 horas en PY sólido, se inoculó 1 ml de medio mínimo para CE3 (ver apéndice) con cada una de las cepas a una D.O. (absorbancia) de 0.1 a $\lambda=600$ nm. A esta mezcla se agregó genisteína 1.2 μ M como inductor de la producción de factores de nodulación y se dejó crecer durante tres horas a 30° C, en agitación. Transcurrido este tiempo, se agregaron a cada muestra 10 μ l de una solución al 10% de D[1-¹⁴C]hidrocloruro de glucosamina y nuevamente se dejaron incubando a 30° C, en esta ocasión por un periodo de 12 hrs.

Las muestras se centrifugaron durante 10 min. El sobrenadante (exudado de bacterias) fue recuperado y pasado por una columna para extracción de fase sólida (cartuchos Sep-Pak C18, Waters, división Millipore) donde los factores de nodulación se embebieron y de la que fue-

ron recuperados eluyendo con 3 ml de metanol. Estas muestras se llevaron a sequedad con nitrógeno, a una temperatura de 35^o C. Las muestras ya secas se resuspendieron en 40 µl de metanol y se aplicaron en punto sobre una placa de sílicagel (20 x 20 cm de superficie, espesor 2 mm; Merck) para cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés).

La placa de TLC se corrió durante 2.5 hr utilizando como eluyente el sistema metanol:cloroformo:amoníaco 5N (43:43:14). Terminado el tiempo de corrida, se dejó secar la placa y se expuso una película (Hyperfilm β-max) sobre ella.

Esta película fue revelada de igual manera que el resto de las autorradiografías.

Cuantificación de Factores de nodulación:

La incorporación de elementos radiactivos y su cuantificación fué medida en un contador de centelleo (LS6000 SC, Beckman Instruments) en medio líquido (Lerouge et.al., 1990). Las bandas completas fueron raspadas de la placa de TLC y cada una se disolvió en 5 ml. de líquido de centelleo (PPO-tolueno) para poder medirlas.

Identificación de plásmidos por la técnica de Eckhardt (Eckhardt, 1978):

Se inocularon 5 ml de PY líquido con una muestra de la cepa deseada y se incubaron durante toda la noche a 30^o C (un cultivo por cepa a analizar). Se tomó una muestra de 1 ml de cada cultivo, se centrifugó durante 1, min y se desechó el sobrenadante. Cada pastilla fue resuspendida en 0.5 ml de sarcosyl 0.1% (en TE pH8

(50/20). Centrifugamos y decantamos el sobrenadante por segunda ocasión y se resuspendió cada pastilla en 0.5 ml de TE pH8(50/20). Centrifugamos las muestras y decantamos el sobrenadante. Se mantuvieron las pastillas a -20° C durante 10 min.

A cada pastilla se le agregaron 40 μ l de solución A (ver apéndice), se resuspendió y se depositó en el fondo de un pozo seco del gel de corrida (gel 0.7% agarosa en tris-boratos 1X, 3mm de espesor). Al terminar de poner todas las muestras en los carriles, esperamos 5 min y agregamos sobre cada muestra 40 μ l de solución B (ver apéndice) y mezclamos suavemente. Agregamos, sobre cada homogenizado, 100 μ l de solución C (ver apéndice) y sellamos los pozos con agarosa 0.7% en tris-boratos 1X.

Se recorrió a corriente constante, a 8mA, durante una hora; posteriormente se corrió a 40 mA durante 4 horas, a voltaje constante.

El gel se tiñó durante 5 min en una solución con bromuro de etidio (1 μ g/ml en H₂O) y se lavó durante 10 min en agua destilada para limpiar los excesos de bromuro. El perfil de plásmidos se observó en una cámara de rayos ultravioleta (Transilluminator 4000, Stratagene) y se fotografió con una película instantánea Mitsubishi K65H.

Resultados:

Mapeo:

Para identificar en pGM1 los límites de la región del pSym de CE3, que se conservaron durante el rearreglo, además de el sitio de cointegración con pA, se hicieron extracciones de DNA total de las cepas CE3, DEM151, CFNX250, CFNX273 y CFNX278, que se digirieron con la enzima de restricción *Bam* HI. El DNA digerido se analizó en geles de agarosa. Estos geles se transfirieron a filtros de nitrocelulosa según la técnica "Southern blot" (Ausubel et.al., 1989). Los filtros se hibridizaron contra los siguientes detectores: cGD 7 y sus bandas 80, 81, 82, 83, 84 y 85 (ver Fig. 6 para localización y Fig. 7a para ver hibridización), y cGD 45 y sus bandas 27, 28 y 29 (ver Fig. 6 para localización y Fig. 7b para ver hibridización). Se utilizaron estos detectores ya que teníamos una idea aproximada de los límites de la zona del pSymCFN42 (Romero & Eparvier, comunicación personal) conservada en pGM1 y queríamos conocer estos límites con mayor precisión.

Para el análisis de los perfiles de hibridización es importante recordar que el genoma de nuestras cepas contiene un alto número de secuencias reiteradas de DNA. El pSym CFN42 tiene aproximadamente 10 familias de secuencias reiteradas (Girard et.al., 1991).

Las autorradiografías de los filtros hibridizados nos permitieron ver un patrón de bandeo silvestre para la cepa CE3 (Fig. 7).

Para la cepa DEM151 obtuvimos un patrón de bandeo igual al silvestre (Fig. 7) con una sola excepción, la cual se observa en la hibridización contra cGD 7. Esta alteración corresponde a la banda 1 y se originó por la inserción de genes *lacZ* y de resistencia a algunos antibióticos en la región de *nifHa* (ver tabla I). La banda 1 aparece desplazada hacia arriba de la banda silvestre ya que tuvo un aumento en su peso molecular.

Para la cepa CFNX250, hibridizando contra cGD 7 y sus bandas (Fig. 7a) observamos que:

1) Las bandas 80 y 81 no están presentes en el plásmido simbiótico pGM1 lo que implica que estas bandas se perdieron durante el rearreglo que dió origen a pGM1.

2) Las bandas 84 y 85 están presentes en pGM1 en su condición silvestre, semejante a CE3. Esto implica que las bandas 84 y 85 no sufrieron alteraciones durante la formación de pGM1 ni influyeron directamente en el rearreglo.

3) La banda 82 no aparece en su posición silvestre, en el perfil nuevo aparece una banda, también nueva, de mayor peso molecular cuyo origen pudiera remontarse a la formación de pGM1.

4) La banda 83 presenta también un perfil de bandeo alterado. La banda original ha desaparecido; pero también ha aparecido una banda nueva de mayor peso molecular que pudiera haberse originado durante el rearreglo genómico.

Las bandas nuevas observadas en los perfiles de hibridización contra las bandas 82 y 83 pudieran o no ser la misma, dado que las bandas nuevas de ambos perfiles parecen tener pesos moleculares similares. Una misma banda podría revelarse en ambos perfiles de hibridización dado que las bandas 82 y 83 silvestres comparten zonas de homología por la existencia de secuencias reiteradas pertenecientes a la familia C.

Hibridizando el DNA de la cepa CFNX250 contra cGD 45 y sus bandas 27, 28 y 29 (Fig. 7b), vemos que:

1) Las bandas 30, 29 y 28 están ausentes en pGM1 lo que implica que se perdieron durante el rearreglo.

2) La banda 26 se presenta en una posición silvestre por lo que podemos decir que no tuvo alteraciones durante la formación de pGM1.

3) La banda 27 original no se observa; las dos bandas que aparecen en el perfil son similares a bandas silvestres correspondientes a reiteraciones. Sin embargo, una de estas bandas (correspondiente a la reiteración de mayor peso molecular) se observa más intensa de lo normal por lo que pudiera ser que, por algún efecto del rearreglo, la banda 27 haya aumentado su peso molecular y coincida con el peso molecular de alguna de las reiteraciones mencionadas.

Los resultados de las hibridizaciones nos indican que el pGM1 tiene desde la banda 82 ú 83 del pSym silvestre hasta la banda 27. El patrón de estas tres bandas

está alterado; es posible que la banda 82 haya sido el sitio de unión con la banda 27 y que la cointegración con pA haya sido en la banda 83.

La cepa CFNX273 (Fig. 7) presenta el mismo patrón de bandeo que la cepa CFNX250 más el perfil de bandeo del cGD 7. Además, muestra un patrón alterado en la banda 27, donde aparecen dos bandas nuevas que pudieran ser parte del vector que lleva al cósmido ó ser un resultado de la cointegración entre pGM1 y este vector.

La cepa CFNX278 (Fig. 7) exhibe el mismo patrón de bandeo que la cepa CFNX250 más el perfil de bandeo de el cGD 45. Presenta también una banda nueva al hibridizar contra las bandas 82 y 83, la cual es de aproximadamente 3.4 Kb, probablemente relacionadas con el vector que lleva al cósmido ó alterada como resultado de la cointegración entre pGM1 y el vector mismo.

Cinética de nodulación:

Se estudió la cinética de nodulación de las cepas CE3, CFNX250 y CFNX253.

Ninguna de las raíces de las plantas estudiadas se veía nodulada para el día seis postinoculación, aunque algunas de ellas presentaban primordios de nódulos. Para el día siete postinoculación se comenzó a ver la formación de nódulos en las raíces de plantas inoculadas con cada una de las tres cepas. Raíces bien noduladas se observaron por primera vez a partir del día ocho postinoculación en plantas de cada uno de los tres tratamientos.

De los 8 datos obtenidos diariamente se calcularon la media y la desviación estándar, para cada uno de los tres tratamientos, y se construyó una gráfica de número de nódulos (media \pm D.S.) vs. tiempo (días) (Fig. 8). En esta gráfica podemos observar que las curvas de cinética de nodulación son similares para las tres cepas y que la cinética de nodulación no está retrasada para ninguna de las tres cepas con respecto a las otras, al menos en lo referente a alteraciones en el rango de días. No podemos saber si existe alguna diferencia, en el rango de horas, que pudiera ser responsable de la diferencia en competitividad de nuestras cepas.

Competitividad:

Los resultados de las pruebas de competitividad entre cepas de *Rhizobium etli* se resumen en las tablas III y IV:

Tabla III. Porcentaje promedio de ocupación de nódulos por cepas de *Rhizobium etli* en competencia con CE3 (en proporción 1:1).*

COMBINACION (cepa 1 vs. cepa 2)	% de ocupación de nódulos por:		
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 1+ Cepa 2
CE3 vs. DEM151	48	49	3
CE3 vs. CFNX250	87	10	3
CE3 vs. CFNX252	65	33	2
CE3 vs. CFNX254	86,7	10,7	2,6
CE3 vs. CFNX255	93	5	2
CE3 vs. CFNX273	86	14	---
(cointegrado)	97	3	---
CE3 vs. CFNX278	76	24	---
(cointegrado)	88	7	5
CE3 vs. CFNX253	50	43	7
CE3 vs. CFNX24	90	10	0

*Determinado por pruebas de resistencia a antibióticos y/o por pruebas de producción de melanina.

Tabla IV. Porcentaje promedio de ocupación de nódulos por diversas cepas de *Rhizobium etli* en competencia (en proporción 1:1).*

COMBINACION (cepa 1 vs. cepa 2)	% de ocupación de nódulos por:	
	Cepa 1	Cepa 2
CFNX250 vs. DEM151	6	94
CFNX250 vs. CFNX252	21	79
CFNX250 vs. CFNX254	56	44
CFNX250 vs. CFNX255	43	57
CFNX250 vs. CFNX273	36	64
CFNX250 vs. CFNX278	18	82
CFNX250 vs. CFNX24	58	42

*Determinado por pruebas de resistencia a antibióticos y/o por pruebas de producción de melanina.

Para el análisis de estos resultados, es importante mencionar que, debido a las grandes variaciones que se presentan, consideramos que cepas que ocupan del 40 al 60% de los nódulos en experimentos de coinoculación son igualmente competitivas. Así, si vemos los resultados reportados en las tablas III y IV, podemos darnos cuenta que:

La fusión transcripcional que se hizo a la cepa DEM151 en *nifHa* no altera su capacidad competitiva con respecto a la cepa parental CE3.

La cepa CFNX250, que ha perdido una gran cantidad de información genética durante la formación de pGM1, ahora ya no puede competir tanto como la cepa silvestre CE3 ni como DEM151. La cepa CFNX250 es ahora una débil competidora.

Si recordamos, se construyeron tres cepas distintas con grandes fragmentos de la región del pSym silvestre más el pGM1 de CFNX250 para buscar una recuperación de el fenotipo de competitividad perdido; estas cepas son CFNX254,

CFNX255 y CFNX252 (ver tabla I y Fig. 5). Como podemos ver en las tablas III y IV, ni la cepa CFNX254 ni la CFNX255 son más competitivas que la cepa CFNX250, por lo que no se logró con ellas una complementación para el fenotipo de competitividad buscado. Por el contrario, con la cepa CFNX252 observamos un aumento en la capacidad competitiva de la cepa, comparativamente con la CFNX250. La recuperación de la capacidad de competir es parcial, dado que esta cepa aún no iguala la capacidad competitiva de la cepa silvestre.

Es importante hacer notar que complementando CFNX250 con pDEL270 obtenemos solamente una restauración parcial de la capacidad competitiva de la cepa. Sin embargo, esta es la cepa complementada con la que se obtuvo la más alta capacidad competitiva.

También se estudió la capacidad competitiva de las cepas de CFNX250 que fueron complementadas con un solo cósmido: CFNX273 y CFNX278. La primera de estas cepas no parece recuperar ni siquiera parcialmente el fenotipo de competitividad buscado; ni cuando se hicieron los primeros experimentos contra CE3 donde el cósmido no se había cointegrado con pGM1, ni después de la cointegración (que además pudo afectar a la cepa en forma desconocida para nosotros; ver perfil de plásmidos Fig. 9). Un primer acercamiento, observando la tabla III, podría hacernos creer lo contrario ya que parece ser que el porcentaje promedio de ocupación de nódulos por la cepa ha aumentado comparativamente al de CFNX250 cuando compite contra CE3; sin embargo, CFNX250 y CFNX273 son igualmente competitivas una con respecto a la otra (Tabla IV) por lo que no podemos decir que la complementación con cGD 7 haya provocado un aumento en competitividad. La segunda de las cepas complementadas con cósmidos, CFNX278, sí parece comple-

mentar, al menos parcialmente, para el fenotipo de competitividad buscado; es decir, esta cepa es más competitiva que la cepa CFNX250, pero menos competitiva que CE3. CFNX278 parece lograr esta complementación parcial aún después del momento de la cointegración del vector usado para introducir el cósmido con pGM1 (Fig. 9); sin embargo, no podemos descartar que la cointegración haya alterado nuestra cepa.

Llevamos a cabo experimentos de competitividad con la cepa CFNX253 (Tabla I). Dado que esta cepa fija de un 30 a un 40% más nitrógeno que la cepa silvestre CE3, y su cepa parental CFNX250 tiene la capacidad de fijar tanto nitrógeno como CE3, quisimos averiguar si la capacidad competitiva de ambas cepas, CFNX250 y CFNX253, era la misma.

Los experimentos de competitividad entre CE3 y CFNX253 nos indican que ambas cepas tienen igual capacidad competitiva. Dado que CFNX253 es un derivado directo de CFNX250 que no ha obtenido información genética nueva con respecto a su cepa parental, sino que solamente se ha amplificado, parece que nos enfrentamos a un fenómeno de epistasis donde una mutación suprime los efectos de otras mutaciones; así, el fenotipo de una doble mutante se asemeja al fenotipo silvestre. En este caso, la duplicación de 120 Kb suple la pérdida de otra región, al menos para el fenotipo de competitividad.

También llevamos a cabo experimentos de competitividad con la cepa CFNX24 (Tabla 1), donde el número de copias de la región amplificada es de 2 y de la región no amplificada es de 1. Queríamos saber si el número de copias de cierta cantidad de

información genética no alteraba la capacidad competitiva de nuestra cepa. Esta observación era fundamental ya que el número relativo de copias de pGM1 es de 2 y el número relativo de copias de pSym CFN42 es de 1 (Romero, comunicación personal).

Los experimentos de competitividad entre CE3 y CFNX24 nos indican que CFNX24 ha perdido su capacidad competitiva frente a CE3 y que la duplicación de información no solo no es benéfica para la cepa sino que parece ser dañina, al menos en cuanto a su capacidad competitiva.

Factores de nodulación:

Como sabemos, los factores de nodulación producidos por una cepa bacteriana son determinantes para lograr la infección de la planta. Cuando nos enfrentamos a una cepa donde casi dos terceras partes de la información contenida en el plásmido simbiótico silvestre se había perdido y esto daba como resultado un descenso en la capacidad competitiva, nos preguntamos si la capacidad de producir factores de nodulación no estaba también alterada y por ello nuestra cepa presentaba un fenotipo de baja competitividad. Así, decidimos analizar el patrón de factores de nodulación de CFNX250 y sus derivadas y compararlo contra la cepa silvestre CE3.

El patrón silvestre de producción de factores de nodulación (ó de sustancias inducibles por flavonoides) de la cepa CE3 se observa en la Fig. 10, este patrón ya ha sido observado con anterioridad (Martínez-Romero, comunicación personal). Se observa claramente que el patrón de factores de nodulación de la cepa DEM151 es igual al patrón silvestre (Fig. 10).

El patrón de factores de nodulación, sin embargo, se ve claramente alterado en la cepa de *Rhizobium etli* CFNX250 (Fig. 10). En esta cepa observamos la pérdida de uno de los factores de nodulación (observada como pérdida de una de las bandas), aquel que es el menos polar; esto implica que alguno de los factores de nodulación silvestres no está siendo producido por esta cepa. Este factor parece ser un factor de nodulación fucosilado y/o carbamylado en su extremo reductor (Martínez-Romero, comunicación personal).

Las cepas CFNX254 y CFNX255 que son cepas con pGM1 más complementaciones de gran parte de las bandas perdidas del pSym silvestre (Fig. 5) producen factores de nodulación con un patrón similar al de la cepa CFNX250 (Fig. 10). Otra de las cepas complementadas CFNX252, que tiene pGM1 más toda la región que se perdió del pSym silvestre (Fig. 5), recupera la capacidad de producir el factor de nodulación perdido en cepas como CFNX250, es decir, recupera el patrón silvestre de producción de factores de nodulación (Fig. 10).

Dos de las cepas con el plásmido pGM1 fueron complementadas, con cósmidos: CFNX273 y CFNX278 (Fig. 5). La primera de estas cepas recupera el patrón silvestre de producción de factores de nodulación, la segunda no (Fig. 10). Esto nos indica que la información genética necesaria para la producción de este factor de nodulación se encuentra en la región correspondiente a cGD 7.

La cepa CFNX24 produce en mayor cantidad el factor de nodulación que representa al compuesto menos polar (la banda superior en el patrón de producción de factores de nodulación); este fenómeno se observa en la Fig. 10 como una banda

de mayor intensidad que sus homólogas para otras cepas. En la Fig. 11 podemos ver que el porcentaje de producción de este factor de nodulación por la cepa CFNX24 con respecto a las otras: CE3 produce un 100% del factor, CFNX24 un 250%, DEM151 y CFNX252 alrededor de un 70% y el resto aproximadamente un 12%.

Para las cepas CFNX253 y CFNX258 observamos también que hay un aumento en la producción de uno de los factores de nodulación presentes en la cepa silvestre en cantidades más bajas. Este factor es el segundo factor menos polar (Figs. 10 y 11) y es producido al 100% por CE3 y CFNX24, al 110-120% por CFNX254 y CFNX255, al 70% por CFNX252 y CFNX250 y al 40% por DEM151; mientras que por CFNX253 es producido al 160%. El porcentaje de producción de factores de nodulación por CFNX258 no fue determinado.

Si existe o no una correlación entre los resultados de competitividad y los de producción de factores de nodulación será analizado en la discusión.

Discusión:

Sabemos que un retraso en la cinética de nodulación de una cepa, que se ha puesto a competir con otra, puede provocar que esta cepa no sea competitiva (Triplett & Sadowsky, 1992). Dado que la cinética de nodulación de las cepas CE3, CFNX250 y CFNX253 es muy similar y, de hecho, la aparición de nódulos es sincrónica para plantas inoculadas por cualquiera de las tres cepas, las diferencias en competitividad entre estas cepas aparentemente no se deben a un retraso en su cinética de nodulación. Pudiera ser, sin embargo, que existiera una diferencia muy pequeña en la cinética de nodulación, una diferencia de horas indetectable siguiendo la metodología que utilizamos y que tal vez requeriría de un experimento en matraces, en cuarto de cultivo, y en el que se tuviera un estricto seguimiento del tiempo a intervalos cortos (en vez de días, horas).

Como hemos visto, las cepas de *Rhizobium etli* CE3, CFNX250 y CFNX253 producen factores de nodulación diferentes. Fisher y Long (1992) y Poupot et.al. (1993) han reportado que la cinética de nodulación de una cepa puede verse alterada por cambios en la concentración y tipo de factores de nodulación que produce. Sin embargo, en el caso de nuestras cepas, vemos claramente que los cambios ocurridos en su producción de factores de nodulación no ha provocado diferencias en su cinética de nodulación.

Nos enfrentamos sin duda a un fenómeno extraño pocas veces reportado con anterioridad donde las diferencias en la capacidad competitiva de diversas cepas no

se refleja en una variación en sus cinéticas de nodulación y, a su vez, estas cinéticas de nodulación no parecen estar afectadas por cambios en la concentración y tipos de factores de nodulación producidos.

Inicialmente, pensábamos que la pérdida de la capacidad de producción de uno de los factores de nodulación en la cepa CFNX250, comparativamente con la cepa silvestre, provocaba la disminución en la capacidad competitiva de la cepa. Esto parecía confirmarse observando el patrón de producción de factores de nodulación de las cepas con el plásmido pGM1 complementadas con pDEL217, pDEL200 y pDEL270 (cepas CFNX254, CFNX255 y CFNX252, respectivamente). Con las dos primeras complementaciones la banda perdida no se recupera ni tampoco el fenotipo de competitividad; es con la tercera complementación, CFNX252, donde vemos recuperada la banda del factor de nodulación perdido en CFNX250 y vemos una recuperación, al menos parcial, del fenotipo de competitividad. Sin embargo, la cepa CFNX273 presenta un patrón de factores de nodulación semejante al de la cepa silvestre y no recupera la capacidad de competir, por lo que, aparentemente, la recuperación de la capacidad de producir el factor de nodulación menos polar no está involucrada con la capacidad de competir ó es solo una parte de esta capacidad. Por otro lado, la cepa CFNX278 presenta, al parecer, un fenotipo de competitividad parcialmente recuperado y no un patrón de producción de factores de nodulación semejante a la cepa silvestre; esto confirma nuestras observaciones anteriores.

Ante este fenómeno extraño cabe preguntarnos si realmente observamos diferencias en producción de factores de nodulación ó si estamos detectando la producción de sustancias diversas, inducibles por flavonoides y con una estructura

química similar, que no funcionan en su totalidad como factores de nodulación. Tal vez deberíamos referirnos a estos compuestos como sustancias inducibles por flavonoides. Para saber si realmente tratamos con factores de nodulación deberíamos aislar cada una de estas sustancias y tratar de inducir con cada una de ellas la formación de pseudonódulos, como han reportado Dénarié y su grupo (1992).

Si descubriéramos que sí estamos tratando con factores de nodulación diversos, encontraríamos tal vez que funcionan de cualquiera de las siguientes maneras:

- 1) Como factores de nodulación cuyo efecto es independiente uno de otro.
- 2) Como factores de nodulación que se complementan mutuamente en su función.
- 3) Como factores de nodulación donde el efecto de uno es dominante sobre el otro.

De estas tres posibilidades, es difícil elegir una como la más probable. Sin embargo, con la información que tenemos hasta ahora pensamos que tratamos con factores que funcionan independientemente uno de otro ó factores donde el efecto de uno es dominante sobre el otro. Pensamos que no se trata de factores de nodulación de efecto complementario ya que, en ese caso, la cepa CFNX273 (cepa con pGM1 y cGD 7) debería mostrar un aumento en su capacidad competitiva con respecto a CFNX250 y CE3. Sin embargo, aún no podemos descartar por completo esta opción ya que pudiera ser que el efecto complementario entre factores de nodulación se reflejara en características independientes de la capacidad competitiva.

Lo que sí sabemos con seguridad, es que estamos tratando con información contenida entre las bandas 80 y 83, correspondientes a cGD 7, en las que no se han encontrado genes *nod* ni *nod* (según reportes en literatura; ver Fig. 4).

El mapeo realizado para buscar los límites del pSym CFN42 conservados en pGM1 y los experimentos de competitividad llevados a cabo con CFNX252, CFNX254 y CFNX255 nos indican que las bandas 27 y 28, correspondientes a cGD 45, parecen ser muy importantes para la competencia, y las bandas 81, 82 y 83, correspondientes a cGD 7, parecen importantes para la producción de factores de nodulación (ó sustancias inducibles por flavonoides) y, tal vez, para la competitividad. Es posible que estas bandas tengan genes u operones completos y sean capaces complementar para estos fenotipos por sí solas; aunque también puede suceder que solo tengan parte de la información necesaria para competencia y producción de factores de nodulación (ó sustancias inducibles por flavonoides) y deban estar unidas a otras bandas para poder funcionar y dar como resultado el fenotipo buscado de competencia elevada y producción de factores de nodulación (ó sustancias inducibles por flavonoides) silvestre.

La cepa CFNX250 es menos competitiva que la cepa silvestre CE3 y, como explicamos anteriormente, estas diferencias no parecen estar relacionadas con las alteraciones en la producción de factores de nodulación. Ahora bien, comparativamente, podemos ver que las cepas CFNX250 y CFNX253 producen los mismos factores de nodulación; sin embargo, la cepa CFNX253 produce mayor cantidad de al menos uno de estos factores (produce aproximadamente el doble; Fig. 11). La cepa CFNX253, además, recupera su capacidad de competir contra la cepa

silvestre. Parece ser que la amplificación *nif-nif* produce un efecto epistático sobre la pérdida de algún(os) gene(s), lo que provoca una recuperación del fenotipo de competitividad que se había perdido durante la formación del pGM1 de la cepa CFNX250.

El fenotipo de competitividad se ve restaurado en la cepa CFNX253 por una amplificación *nif-nif* y, como ya dijimos, pensamos que nos enfrentamos a un fenómeno de epistasia ya que en el plásmido simbiótico silvestre no se observa una alteración en la capacidad competitiva de cepas con amplificaciones similares: cepas con un pSym CFN42 con tres a cuatro amplificaciones *nif-nif* no presentan un fenotipo alterado en competitividad, son necesarias ocho amplificaciones como ésta para observar un fenotipo de disminución en la capacidad competitiva (Martínez-Romero, comunicación personal; Romero, comunicación personal).

El aumento en competitividad de la cepa CFNX253 es resultado de la amplificación pero solamente puede observarse este aumento cuando tratamos con un plásmido simbiótico como el pGM1. Este dato está corroborado por las amplificaciones ya mencionadas del pSym CFN42 y por los datos de competitividad de la cepa CFNX24 donde vemos que una amplificación tipo pGM1 (o tal vez un poco mayor) en un plásmido simbiótico silvestre lleva a una disminución en la capacidad competitiva de la cepa.

Esta epistasia o supresión, puede haber sido originada de cualquiera de la siguientes maneras; supongamos que A es un gene perdido total o parcialmente durante la formación de pGM1 y B es un gene presente en pSym CFN42 y conserva-

do en pGM1 (modelo tomado de Guarente,1993):

A) Supresión gene específica, alelo no específica: Si el supresor B* trabaja en cualquier alelo mutante de A, puede suprimir la necesidad de tener el producto del gene A.

A.1) Supresión desviada (Fig. 12a): Si A y B funcionan en vías bioquímicas o genéticas paralelas, la mutación B* fortalece esta vía paralela cuando A ha sido mutada (A*).

A.2) Supresión por epistasis (Fig. 12b): Si A y B funcionan en la misma vía, B* es capaz de restituir el fenotipo silvestre cuando existe A*.

B) Supresión gene específica, alelo específica (Fig. 12c): A y B son genes que interactúan directamente; una mutación no-nula en A (A*) puede ser suprimida por un gene interaccional B*.

De estas tres posibilidades, cualquiera de la dos primeras resulta más factible que la tercera ya que la mutación con la que trabajamos parece ser únicamente la duplicación de cierta información genética. Así, el aumento en la actividad de B (por el incremento en su número de copias, B*) da el refuerzo necesario para suprimir la pérdida de A.

Nuestro gene B podría rastrearse siguiendo la misma estrategia que utilizamos para rastrear los sitios de complementación para los fenotipos de competitividad y de producción de factores de nodulación. Esto es, haciendo complementaciones de CFNX250 con distintos cósmidos correspondientes a la región del pSym CFN42 conservada en pGM1 (cGD 101, cGD 102, cGD 28, cGD 15 y cGD 35; Fig. 6a).

No hemos logrado, con ninguna de nuestras complementaciones, obtener un fenotipo de competitividad igual entre la cepa silvestre CFN42 y la cepa CFNX250, probablemente debido a la diferencia en el número relativo de copias entre los plásmidos simbióticos de ambas cepas que es de 1 para el pSym CFN42 y de 2 para pGM1 (Romero, comunicación personal). Sin embargo, si solamente fuera importante el número relativo de copias entre un plásmido y otro y el número relativo de copias entre el pGM1 y la complementación con cGD 45, deberíamos de haber logrado una complementación completa al fenotipo de competitividad con la cepa CFNX278 cuando no se había llevado a cabo la cointegración ya que el vector que contenía a cGD 45 tiene un origen de replicación que acepta un número relativo de copias de 3 ó 4. Sin embargo, este fenómeno podría ser redundante, es decir, tal vez necesitaríamos un origen de replicación que acepte un número relativo de copias exactamente igual al de pGM1 (que es el de pA).

Además, aunque no existe una correlación directa entre la pérdida de la capacidad de producción de uno de los factores de nodulación y la pérdida de la capacidad competitiva, es probable que sea necesaria la presencia de la información genética que codifica para cada uno de estos fenómenos (contenida en cGD 7 y cGD 45) para recuperar totalmente la capacidad competitiva. Sin embargo, existe también la posibilidad de que nuestra cepa CFNX278 no recupere totalmente su capacidad competitiva porque requiera información genética de la pérdida durante la formación de pGM1 y que no está incluida ni en cGD 7 ni en cGD 45.

Perspectivas:

Este trabajo será continuado con el principal objetivo de identificar los genes específicos que alteran competitividad, siguiendo distintas estrategias:

1) Para identificar los genes involucrados en competencia presentes en cGD 45, clonaremos cada una de sus bandas (desde 26 hasta 30) en un vector autorreplicable en *Rhizobium etli*, como pRK7813, y conjugaremos a la cepa CFNX250. Con esta nueva construcción haremos experimentos de competitividad para tratar de rastrear aquella banda donde se encuentran los genes que nos interesan.

Si con ninguna de las bandas logramos una complementación para nuestro fenotipo de competitividad (porque al cortar las bandas interrumpamos algunos genes u operones), procederemos a cortar cGD 45 en fragmentos mayores a sus bandas y con ellos haremos las pruebas de competitividad.

El fragmento seleccionado como complementario, se cortará al tamaño mínimo necesario para que continúe su complementación, se secuenciará y se buscará su distribución en la especie mediante pruebas de hibridación y comparación de secuencias. Trataremos de determinar la función específica de estos genes por técnicas de mutación dirigida.

2) Para identificar los genes involucrados en la producción de factores de nodulación presentes en cGD 7, seguiremos una estrategia similar a la mencionada

para los genes de competencia en cGD 45, utilizando las bandas 80 a 84 de este cósmido.

3) Para identificar los genes responsables del efecto epistático en la cepa CFNX253, seguiremos una estrategia experimental como la que utilizamos a lo largo de este trabajo; haremos complementaciones de la cepa CFNX250 con los distintos cósmidos que abarcan la región amplificable *nif-nif* : cGD 102, cGD 101, cGD 28, cGD 15 y cGD 35. Con cada una de las cepas construidas, se harán experimentos de competitividad para buscar aquella que sea tan competitiva como CE3.

Conclusiones:

*Las diferencias en competitividad entre CE3 y CFNX250 no se deben a un cambio en la cinética de nodulación.

*Al menos una región, contenida en las 220 Kb del pSym que no se encuentran en pGM1, posee información necesaria para la competencia por la nodulación.

*El segmento cGD 45 complementa parcialmente, para el fenotipo de competitividad, a pGM1. Esto indica que alguna región entre las bandas 26 y 30 participa en la competitividad, pareciendo esenciales las bandas 26,27 y 28.

*No hemos encontrado una correlación directa entre la producción de factores de nodulación y el fenotipo de competitividad.

*El segmento cGD 7 complementa el fenotipo de producción de factores de nodulación. Alguna región entre las bandas 80 y 85 participa para la obtención de este fenotipo, pareciendo esenciales las bandas 81, 82 y 83.

*Una amplificación *nif-nif* como la de la cepa CFNX253 permite una recuperación total de la capacidad competitiva, probablemente por un efecto epistático.

Aunque aún no sabemos con exactitud qué genes se perdieron durante la formación de pGM1 y no sabemos cómo funcionan, hemos logrado identificar una zona (correspondiente a cGD 45) de aproximadamente 20 Kb donde pueden estar localizados genes involucrados en la competitividad de una cepa. También hemos identificado una zona (correspondiente a cGD 7) de aproximadamente 21 Kb involucrada en la producción de un factor de nodulación y que no ha sido relacionada con ninguno de los genes *nod* ni *noi* conocidos.

El conocimiento de genes específicos para competencia por la nodulación nos permitirá comprender mejor los factores genéticos que regulan la simbiosis. El avance en el conocimiento científico sobre el fenómeno de nodulación se reflejará sin duda alguna en el mejoramiento de las técnicas agrícolas actuales, aumentando la producción, mejorando la economía de los productores y disminuyendo la contaminación ambiental para la conservación de nuestra biósfera.

Figuras

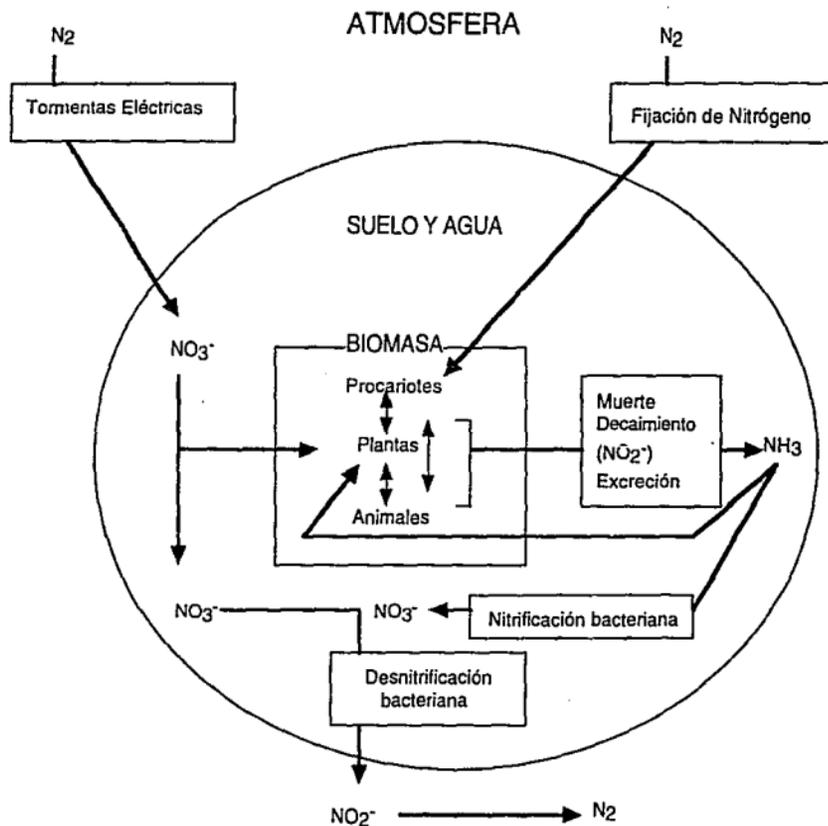


Fig. 1. Ciclo del Nitrógeno. (Modificado de Sprent & Sprent, 1990)

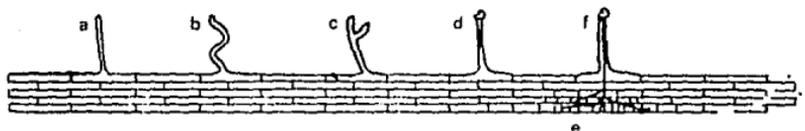


Fig. 2 Estadios iniciales de la simbiosis *Rhizobium* -leguminosa.

Los factores de nodulación señal llegan a los pelos radiculares (a) y provocan la deformación del pelo radicular (b), su ramificación (c) y enroscamiento (d), así como mitosis en el cortex (e), lo que culmina en la formación del primordio nodular. Las bacterias invaden las células de la planta a través del hilo de infección (f), un tubo derivado de la planta que deposita a las bacterias en células individuales en el primordio nodular. Es en este punto donde las bacterias se diferencian a bacteroides y comienzan a fijar nitrógeno. (*, epidermis; **, cortex; Tomado de Fisher & Long, 1992).

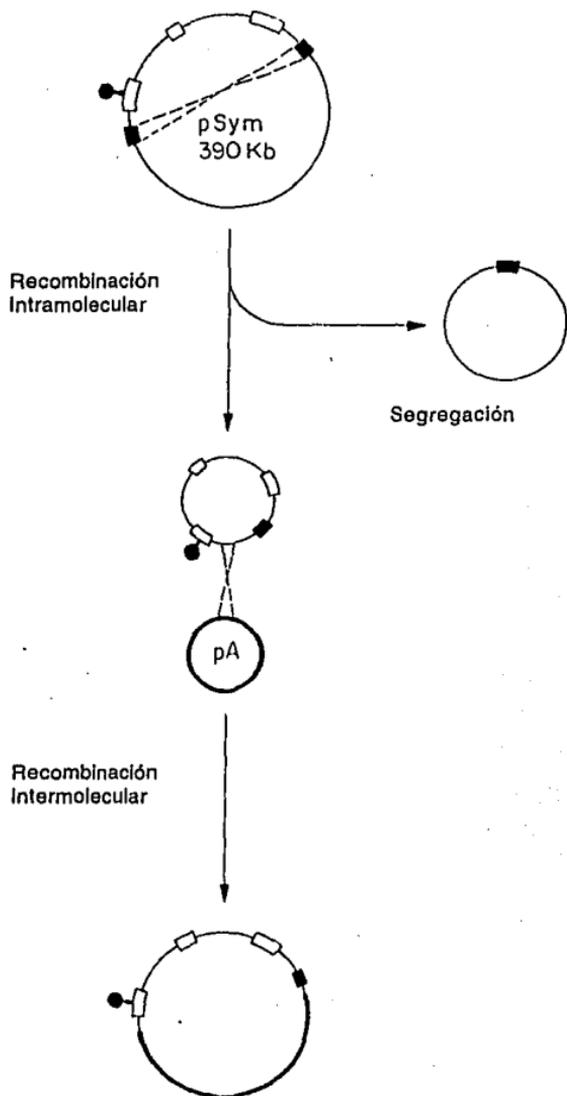


Fig. 3. Mecanismo propuesto para la formación del plásmido pGM1.
(Romero, comunicación personal).

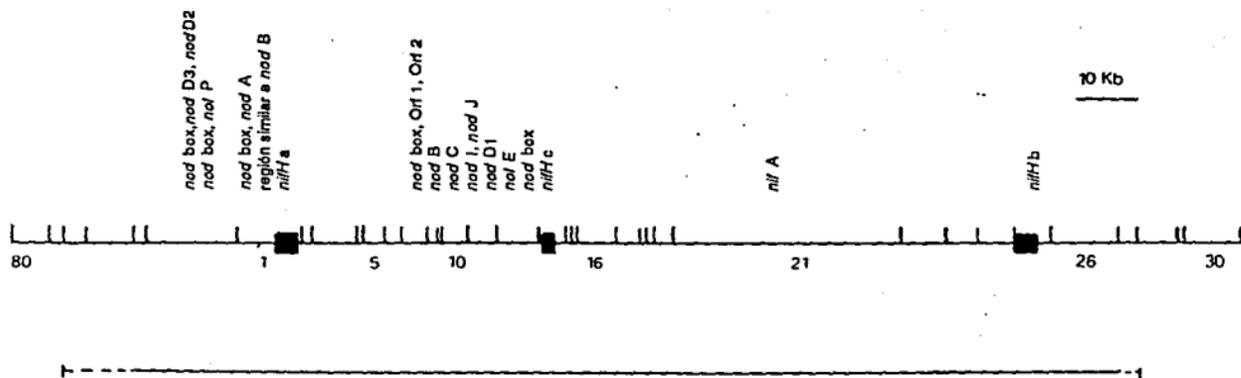


Fig. 4. Mapa físico de la región del *pSym* en *pGM1* (límites señalados por la línea debajo del mapa).
 (Modificado en base a información de Girard et.al.,1991; Davis & Johnston, 1990a y 1990b; Romero,1993;
 Vázquez et.al.,1991; Vázquez, et.al., 1993).

Fig. 5a)

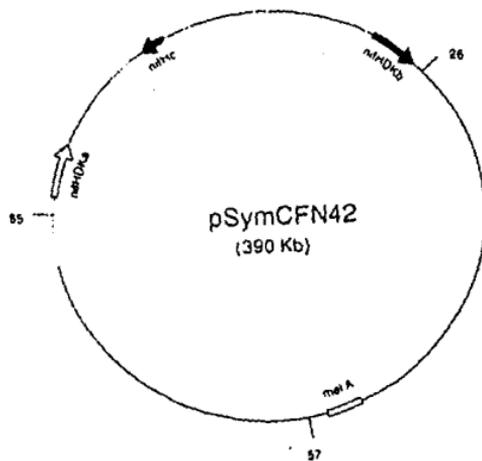


Fig. 5b)

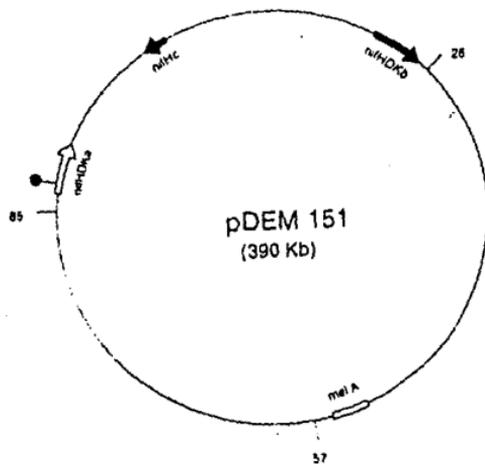


Fig. 5c)

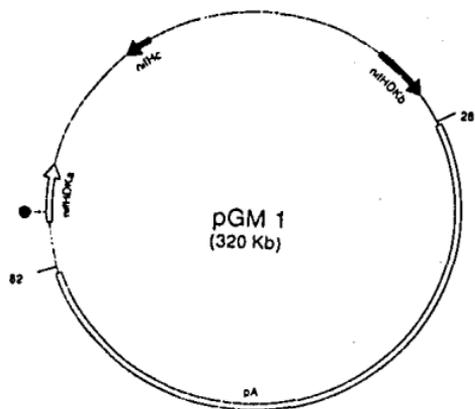
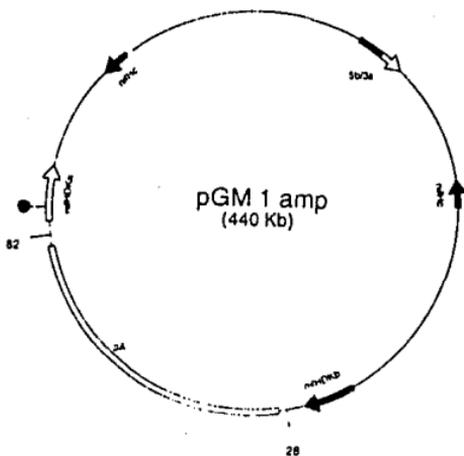


Fig. 5d)



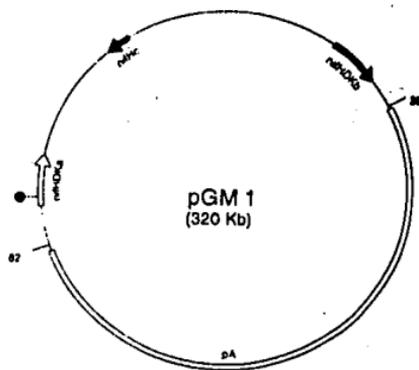
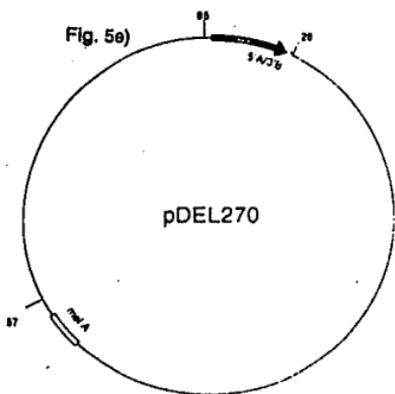
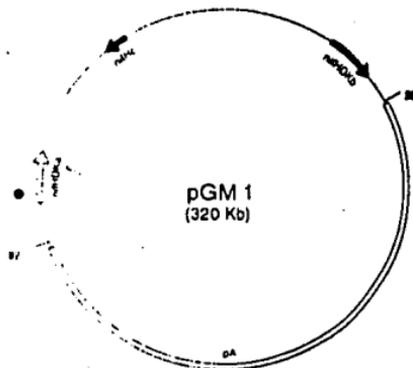
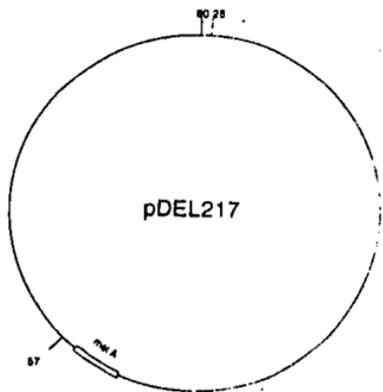


Fig. 5f)



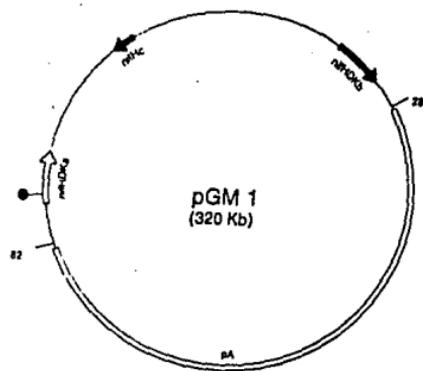
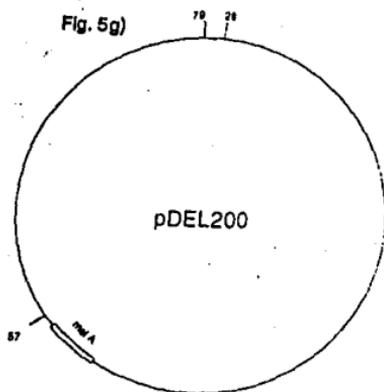


Fig. 5h)

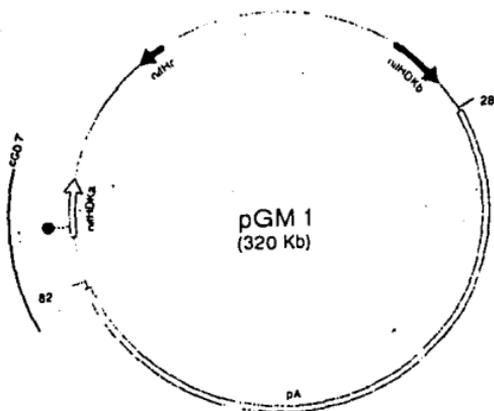


Fig. 5i)

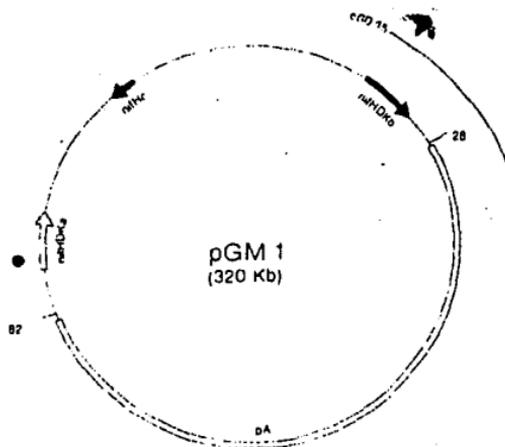


Fig. 5. Plásmidos simbióticos y complementaciones de cepas de *Rhizobium etli* utilizadas en este estudio. Cepa a) CFNX42 y CE3, b) DEM151, c) CFNX250, d) CFNX253, e) CFNX252, f) CFNX254, g) CFNX255, h) CFNX273 e i) CFNX278.

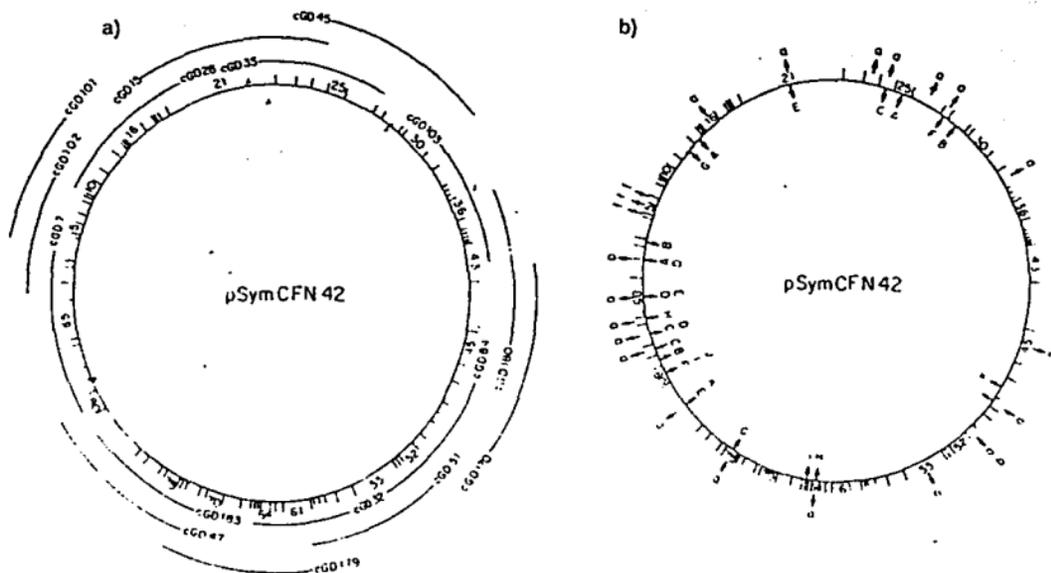


Fig.6. pSym CFN42. a) Mapa físico y cósmidos (cGD; clonados en el vector Lorist); b) Secuencias reiteradas en pSym. Las letras mayúsculas representan a las 11 familias reiteradas y están representadas por las flechas internas; las flechas externas indican fragmentos de homología con plásmidos pa (a), pb (b) y pf (f). En ambas figuras, las líneas que irradian del círculo representan sitios de restricción de *Bam* HI (Tomado de Girard et.al., 1991).

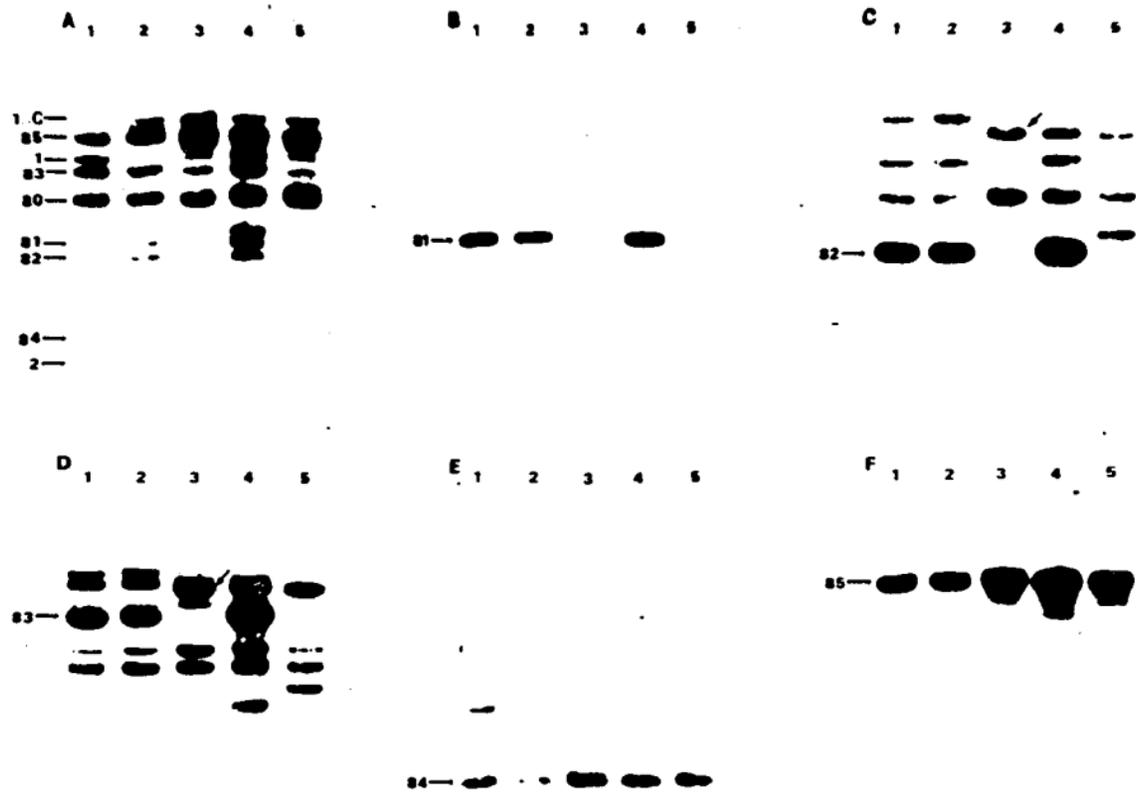


Fig. 7a. Perfil de hibridación de DNA de cepas de *Rhizobium etli*. Carril 1, CE3; 2, DEM151; 3, CFNX250, 4, CFNX273 y 5, CFNX278, contra distintos detectores: A, contra cGD 7; B, contra banda 81; C, contra banda 82; D, contra banda 83; E, contra banda 84 y F, contra banda 85. Las flechas marcan la aparición de bandas nuevas.

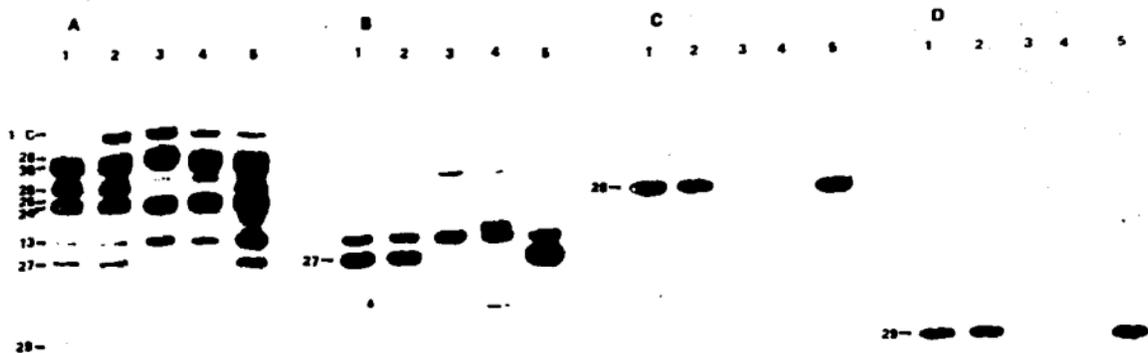


Fig. 7b. Perfil de hibridización de DNA de cepas de *Rhizobium etli*. Carril 1, CE3; 2, DEM151; 3, CFNX250, 4, CFNX273 y 5, CFNX278, contra distintos detectores: A, contra cGD 45; B, contra banda 27; C, contra banda 28 y D, contra banda 29.

No. de nódulos formados (\pm D.S.)

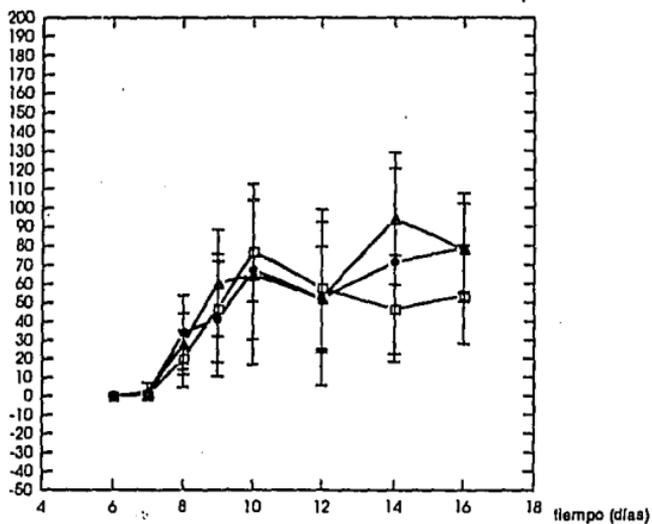


Fig. 8. Cinética de nodulación de cepas de *Rhizobium etli* :
○ , CE3; □ , CFNX250; △ , CFNX253.



Fig.9. Perfil de plásmidos de cepas CE3 (carril 1), CFNX250 (carriles 2 y 3), CFNX273 (con cGD.7 cointegrado a pGM1; carril 4) y CFNX278 (con cGD 45 cointegrado a pGM1; carril5). El asterisco a la izquierda de cada carril señala al plásmido simbiótico.

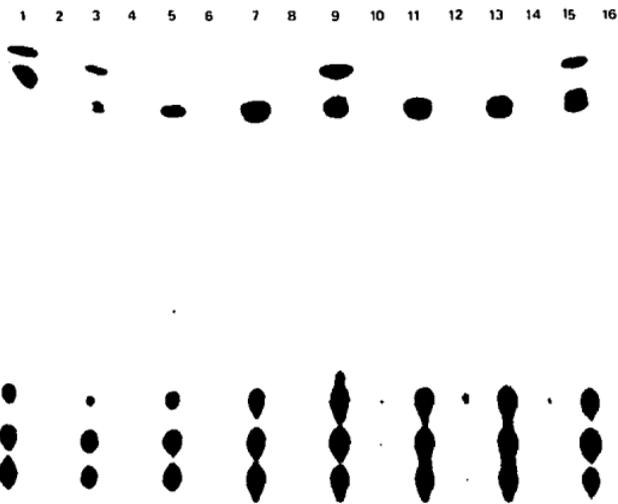


Fig. 10a. Patrón de producción de factores de nodulación por cepas de *Rhizobium etli*.

Carriles 1 y 2, cepa CE3; 3 y 4, DEM151; 5 y 6, CFNX250; 7 y 8, CFNX253; 9 y 10, CFNX24; 11 y 12, CFNX254; 13 y 14, CFNX255; 15 y 16, CFNX252.

La flecha marca la banda del factor de nodulación menos polar.

(En los carriles nones se indujo con genistéfina para producción de factores de nodulación, en los carriles pares no hubo inducción)



Fig. 10b. Patrón de producción de factores de nodulación por cepas de *Rhizobium etli*.

Carriles 1y 2, cepa CE3; 3, DEM151; 4, CFNX250; 5, CFNX253; 6, CFNX258;

7, CFNX24; 8, CFNX254; 9, CFNX252; 10, CFNX273; 11, CFNX278.

La flecha marca la banda del factor de nodulación menos polar.

(En todos los carriles nones se indujo la producción de factores de nodulación, excepto en el carril 2).

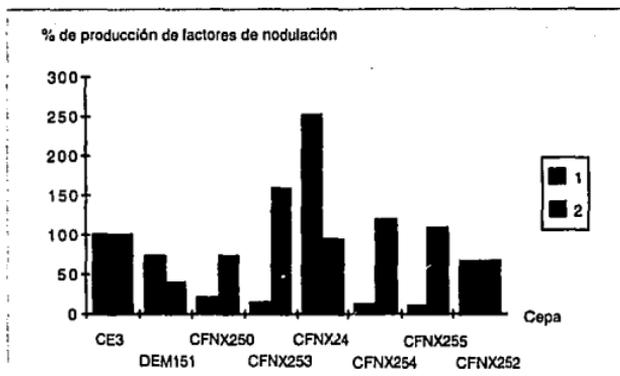
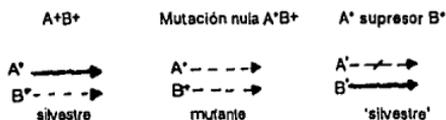


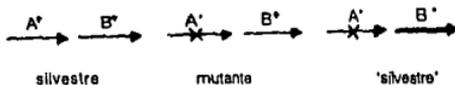
Fig. 11. Porcentaje de producción de factores de nodulación por diversas cepas de *Rhizobium etli* (inducidos por genisteína).
 1, primer factor de nodulación menos polar ;
 2, segundo factor de nodulación menos polar.

A) Supresión gene específica, alelo no específica:

A.1) Supresión desviada



A.2) Supresión por epistasia



B) Supresión gene específica, alelo específica:

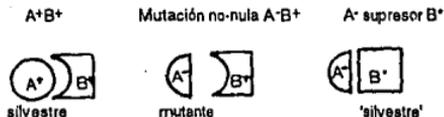


Fig. 12. Tipos de supresión, agrupados por especificidad génica y alélica.

(Explicación en el texto, tomado de Guarente, 1993).

Apéndice:

Soluciones varias utilizadas en la realización de este trabajo, mencionadas en material y métodos.

Buffer de columna:

REACTIVO	[] STOCK*	VOLUMEN (ml) A UTILIZAR PARA 200 ml DE SOLUCION**	[] FINAL
Tris-Base pH8	1 M	2.0	10 mM
NaCl	5 M	4.0	100 mM
EDTA	0.25 M	0.8	1 mM
SDS	10%	0.2	0.01%
NaN ₃	1 M	0.2	1 mM

*Solvente: H₂O destilada

**Se filtra la mezcla final y se esteriliza durante 25 min en autoclave.

Solución Norris modificada:

REACTIVO	CANTIDAD (g)
1)KCl	5.96
2)K ₂ HPO ₄	2.00
3)KH ₂ PO ₄	4.00
4)CaSO ₄	10.88
4 CaSO ₄ ·2H ₂ O	13.76
5)MgSO ₄ ·7H ₂ O	19.72

6) Para 1 l de solución en H₂O destilada:

REACTIVO	CANTIDAD (g)
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.44
MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.40
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.02
H ₃ BO ₃	1.43

7) Para 1 l de solución en H₂O destilada:

REACTIVO	CANTIDAD (g)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0
Acido Cítrico	5.0

Se disuelven 1, 2, 3 y 5 en 36 l de H₂O destilada, se le agregan 20 ml de la solución 6 y 40 ml de la solución

7. En 4 l de H₂O destilada se disuelve 4.

Ambas soluciones se esterilizan en autoclave, se dejan enfriar y se mezclan.

La solución nutritiva está lista para ser utilizada.

Medio mínimo para CE3:

REACTIVO	[] STOCK*	VOLUMEN (ml) A UTILIZAR PARA 100 ml DE SOLUCIÓN**
K ₂ HPO ₄	2.0%	0.86
MgSO ₄	2.0%	1.27
KNO ₃	5.5%	0.20
KH ₂ PO ₄	10.0%	1.00
NaCl	2.0%	0.80
Trazas Gibson	1000X	0.10
Biotina**	10 mg/ml	0.10
Sacarosa	0.2 g/ml	1.00
CaCl ₂	0.01 g/ml	1.00
Citrato Fórmico	0.005 g/ml	1.00

*Solvente: H₂O destilada

**Agregar 6-8 gotas de NaOH 1M para disolver.

*Todas las soluciones stock deben esterilizarse durante 25 min en autoclave antes de mezclarse.

Trazas Gibson 1000X:

REACTIVO	CANTIDAD (para 1 l de solución')
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.03 g
ó MnSO ₄ ·H ₂ O	1.54 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	80 mg
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	100 mg
ó Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	106 mg

*Solvente: H₂O destilada

Soluciones utilizadas en la técnica de Eckhardt (modificado de Eckhardt, 1978):

Solución A:

Reactivo	Concentración	Observaciones
Lisozima RNAasa	7,500 u/ml 0.3 u/ml	Disuelto en TB 1X. Se disuelve previamente en amortiguador acetato de sodio 0.4 M (pH 4.0) a una concentración de 10 mg/ml. Se calienta 2 min a 98° C antes de mezclar con el resto de la solución.
Azul de Bromofenol en TB pH 8.2, 1X	0.05%	
Ficoll (400,000)	20%	Disuelto en 8 ml de TB 1X.
Xileno-cloro!	0.05%	

Se mezclan los compuestos en el orden siguiente: 1)ficoll, 2)lisozima, 3)RNAasa y 4)Colorantes.
Se almacenan alícuotas de 450 µl a -20° C.

Tris Boratos (TB pH 8,2) 1X:

Reactivo	Concentración
Tris	89 mM
EDTA (disódico)	12.5 mM
Acido bórico	8.9 mM

Solución B:

Reactivo	Concentración
SDS en TB 1X	0.2%
Ficoll (400,000) en TB 1X	10%

Solución C:

Reactivo	Concentración
SDS en TB 1X	0.2%
Ficoll (400,000) en TB 1X	5%

Literatura citada:

Araujo,R.S., E.A.Robleto y J.Handelsman. 1994. A Hydrophobic Mutant of *Rhizobium etli* Altered in Nodulation Competitiveness and Growth in the Rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology 60(5): 1430-1436.

Ausubel,F.M., R.Brent, R.E.Kingston, D.D.Moore, J.G.Seidman, J.A.Smith y K.Struhl. (eds.) 1987. Current Protocols In Molecular Biology. John Wiley & Sons, USA. Capitulo 2.

Ausubel,F.M., R.Brent, R.E.Kingston, D.D.Moore, J.G.Seidman, J.A.Smith y K.Struhl. (eds.) 1989. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, USA. 387 p.

Beattie,G.A., M.K.Clayton y J.Handelsman. 1989. Quantitative Comparison of the Laboratory and Field Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Applied and Environmental Microbiology 55(11): 2755-2761.

Beattie, G.A. y J.Handelsman. 1993. Evaluation of a Strategy for Identifying Nodulation Competitiveness Genes In *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* . Journal of General Microbiology 139: 529-538

Bohlool, B.B., J.K.Ladha, D.P.Garrity y T.George. 1992. Biological Nitrogen Fixation for Sustainable Agriculture: A Perspective. En: Ladha, J.K., T.George y B.B.Bohlool (eds.). 1992. Biological Nitrogen Fixation for Sustainable Agriculture. Kluwer Academic Publishers & International Rice Research Institute, The Netherlands. pp 1-11.

Brewin, N.J., E.A.Wood y J.P.W.Young. 1983. Contribution of the Symbiotic Plasmid to the Competitiveness of *Rhizobium Leguminosarum*. Journal of General Microbiology 129: 2973-2977.

Brom, S., A.García de los Santos, T.Stepkowsky, M.Flores, G.Dávila, D.Romero y R.Palacios. 1992. Different Plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are Required for Optimal Symbiotic Performance. Journal of Bacteriology 174(16): 5183-5189.

Caetano-Anollés, G. y P.M.Gresshoff. 1991. Plant Genetic Control of Nodulation. Annual Review of Microbiology 45: 345-382.

Campbell, R. 1987. Ecología Microbiana. Limusa, México. 268 pp.

Davis, E.O. y A.W.B.Johnston. 1990a. Analysis of three *nodD* genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*; *nodD* is preceded by *noIE*, a Gene whose Product is Secreted from the Cytoplasm. Molecular Microbiology 4(6): 921-932.

Davis,E.O. y A.W.B.Johnston. 1990b. Regulatory Functions of the three *nodD* Genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* . Molecular Microbiology 4(6): 933-941.

Dénarié,J., F.Debellé y C.Rosenberg. 1992. Signaling and Host Range Variation in Nodulation. Annual Review of Microbiology 46: 497-531.

Dowling,D.N. y W.J.Broughton. 1986. Competition for Nodulation of Legumes. Annual Review of Microbiology 40: 131-157.

Fisher,R.F. y S.R.Long. 1992. *Rhizobium*-plant Signal Exchange. Nature 357: 655-660.

Girard,M.deL., M.Flores, S.Brom, D.Romero, R.Palacios y G.Dávila. 1991. Structural Complexity of the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Journal of Bacteriology 173(8): 2411-2419.

Guarente,L. 1993. Synthetic Enhancement in Gene Interaction: A Genetic Tool come of Age. Trends in Genetics 9(10): 362-366.

Kapulnik,Y., C.M.Joseph y D.A.Phillips. 1987. Flavone Limitations to Root Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation in Alfalfa. Plant Physiology 84(4): 1193-1196.

Lerouge,P., P.Roche, C.Faucher, F.Mallet, G.Truchet, J.C.Promé y J.Denarié. 1990. Symbiotic Host-Specificity of *Rhizobium meliloti* is Determined by a Sulphated and Acylated Glucosamine Oligasaccharide Signal. Nature 344: 781-784.

Long,S.R. 1989. *Rhizobium* Genetics. Annual Review of Genetics 23: 483-506.

Martinez-Romero,E. y M.Rosenblueth. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Nodulation Competitiveness of genetically Modified *Rhizobium* strains. Applied and Environmental Microbiology 56(8): 2384-2388.

Martínez,E., D.Romero y R.Palacios. 1990. The *Rhizobium* Genome. Critical Reviews in Plant Sciences 9(1): 59-93.

Noel,K.D., A.Sánchez, L.Fernández, J.Leemans y M.A.Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* Symbiotic Mutants with Transposon Tn5 Insertions. Journal of Bacteriology 158(1): 148-155.

Peoples,M.B. y E.T. Craswell. 1992. Biological Nitrogen Fixation: Investments, Expectations and actual Contributions to Agriculture. En: Ladha,J.K., T.George y B.B.Bohlool (eds.).1992. Biological Nitrogen Fixation for Sustainable Agriculture. Kluwer Academic Publishers & International Rice Research Institute, The Netherlands. pp 13-39.

Poupot,R., E.Martínez-Romero y J.C.Promé.1993. Nodulation Factors from *Rhizobium tropici* Are Sulfated or Nonsulfated Chitopentasaccharides Containing an N-Methyl-N-acylglucosaminyl Terminus. Biochemistry 32(39): 10430-10435.

Quinto,C., H.de la Vega, M.Flores, L.Fernández, T.Ballado, G.Soberón y R.Palacios. 1982. Reiteration of Nitrogen Fixation Sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature 299: 724-726.

Quinto,C., H.de la Vega, M.Flores, J.Leemans, M.A.Cevallos, M.A.Pardo, R.Azpiroz, M.de L.Girard, E.Calva y R.Palacios.1985. Nitrogenase Reductase: A Functional Multigene Family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1170-1174.

Romero,D. 1993. A Genomic Rearrangement that generate a Self-transmissible Symbiotic Plasmid in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. En: Palacios,R., J.Mora y W.E.Newton (eds.).1993. New Horizons in Nitrogen Fixation. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp 647.

Romero,D., S.Brom, J.Martínez-Salazar, M.de L.Girard, R.Palacios y G.Dávila. 1991. Amplification and Deletion of a *nod-nif* Region in the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium phaseoli*. Journal of Bacteriology 173(8): 2435-2441.

Romero,D., P.W.Singleton, L.Segovia, E.Morett, B.B.Bohlool, R.Palacios y G.Dávila. 1988. Effect of Naturally Occurring *nif* reiterations on Symbiotic Effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. Applied and Environmental Microbiology 54(3): 848-850.

Sanjuan,J. y J.Olivares.1989. Implication of *nifA* in Regulation of Genes Located on a *Rhizobium meliloti* Cryptic Plasmid That Affect Nodulation Efficiency. Journal of Bacteriology 171(8): 4154-4161.

Sanjuan,J y J.Olivares.1991a. Multicopy Plasmids Carrying the *Klebsiella pneumoniae nif A* Gene Enhance *Rhizobium meliloti* Nodulation Competitiveness on Alfalfa. Molecular Plant-Microbe Interactions 4(4): 365-369.

Sanjuan,J. y J.Olivares. 1991b. NifA-NtrA Regulatory System. Activates Transcription of *nfe* a Gene Locus Involved in Nodulation Competitiveness of *Rhizobium meliloti*. Archives of Microbiology 155: 543-548.

Segovia,L., J.P.W.Young y E.Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* Strains as *Rhizobium etli* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 43(2): 374-377.

Soto,M.J., A.Zorzano, J.Mercado-Blanco,V.Leppek, J.Olivares y N.Toro. 1993. Nucleotide Sequence and Characterization of *Rhizobium meliloti* Nodulation competitiveness genes *nfe*. Journal of Molecular Biology 229: 570-576.

Sprent,J. y P.Sprent. 1990. Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects. Chapman and Hall, USA. pp 1-54.

Streit,W., K.Kosch y D.Werner. 1992. Nodulation Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* and *Rhizobium tropici* Strains Measured by Glucuronidase (*gus*) Gene Fusion. Biol. Fertil Soils 14: 140-144.

Toro, N. y J. Olivares. 1986. Characterization of a large Plasmid of *Rhizobium melliottii* Involved in Enhancing Nodulation. Molecular & General Genetics 202: 331-335.

Triplett, E.W. 1990. Construction of a Symbiotically Effective Strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with Increased Nodulation Competitiveness. Applied and Environmental Microbiology 56(1): 98-103.

Triplett, E.W. y M.J. Sadowsky. 1992. Genetics of Competition for Nodulation of Legumes. Annual Review of Microbiology 46: 399-428.

Valderrama, M.B. 1993. Análisis Estructural y de Expresión de los Genes Reiterados para la Nitrogenasa en *Rhizobium phaseoli*. Tesis de Maestría en IBB, CIFN, UNAM.

Vázquez, M., A. Dávalos, A. de las Peñas, F. Sánchez y C. Quinto. 1991. Novel organization of the Common Nodulation Genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. Journal of Bacteriology 173(3): 1250-1258.

Vázquez, M., O. Santana y C. Quinto. 1993. The NodI and NodJ proteins from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Strains are Similar to Capsular Polysaccharide Secretion Proteins from Gram-negative Bacteria. Molecular Microbiology 8(1): 369-377.

Yates, M.G. 1992. The Enzymology of Molybdenum-Dependent Nitrogen Fixation. En: Stacey, G., R.H. Burris y H.J. Evans (eds.). 1992. Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, USA. pp 685-735.

Wolff, A.B., W. Streit, J.A. Kipe-Nolt, H. Vargas y D. Werner. 1991. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* Strains in Relation to Environmental Stress and Plant Defense Mechanisms. Biol. Fertil. Soils 12: 170-176.