

03062 /
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE
FIJACIÓN DE NITRÓGENO**

**“MEJORAMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium meliloti* -
ALFALFA A TRAVÉS DE LA AMPLIFICACIÓN
ESPECÍFICA DE DNA (SDA) EN EL MICROSIMBIONTE”**

**TESIS, QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA, PRESENTA:
MARCELA CASTILLO FIGA**

CUERNAVACA, MOR. 1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

270710



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Palacios y a la Dra. Georgina Hernández por haber aceptado el reto de asesorar y dirigir este trabajo.

A los integrantes del Jurado: Dra. Valeria Souza, Dr. Mario Soberón y Dr. Sergio Sánchez por la revisión de esta tesis.

A Vicky, Fosy, Patrick, Margarita y Miguel por la asesoría brindada en las técnicas utilizadas en este trabajo.

A César, por sus acertadas sugerencias y observaciones a lo largo de la fase experimental de este trabajo.

A Paty Pineda y Mario por su apoyo en el trabajo de computación.

A los integrantes de los laboratorios de la Dra. Georgina Hernández, de la Dra. Esperanza Martínez, del Dr. David Romero y del Dr. Jaime Mora por la asesoría brindada en la realización de algunos experimentos.

Muy especialmente a los amigos que siempre estuvieron a mi lado: Vicky, César, Adriana, Javier, Hilda, Sandra, Ramón, Liza, Gaby y Bere.

Gracias por su paciencia y cariño.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

- I. La simbiosis *Rhizobium* - leguminosa
- II. La simbiosis *Rhizobium meliloti* - alfalfa
- III. Dinámica del genoma de *Rhizobium*
 - III.1 Secuencias de DNA reiterado
 - III.2 Amplificación génica
- IV. Manipulación del genoma por amplificación génica

OBJETIVOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

METODOS

- I. **Cepas bacterianas y plásmidos utilizados**
- II. **Construcción del plásmido pCH1**
 - II.1 Purificación de DNA plasmídico
 - II.2 Restricción y desfosforilación del DNA
 - II.3 Ligación
 - II.4 Análisis de las clonas obtenidas
- III. **Construcción de cepas modificadas de *R. meliloti* derivadas de las cepas silvestres 41 y 1021**
 - III.1 Selección de cepas con el fragmento *Eco* R1 cointegrado
 - III.2 Comprobación de la cointegración del fragmento *Eco* R1 en el genoma de *R. meliloti*
 - III.3 Selección de cepas de *R. meliloti* con mayor número de copias del fragmento *Eco* R1
 - III.4 Análisis densitométrico para determinar el número de copias en cada cepa
- IV. **Determinación del fenotipo simbiótico**
 - IV.1 Germinación, crecimiento y mantenimiento de las plantas de alfalfa
 - IV.2 Parámetros evaluados en las plantas inoculadas con las distintas cepas modificadas de *R. meliloti*
 - IV.3 Estabilidad de la amplificación durante la simbiosis

RESULTADOS

- I. Obtención de cepas de *R. meliloti* con mayor número de copias de DNA de una región específica
- II. Determinación del fenotipo simbiótico
 - II.1 Estabilidad de la amplificación durante la simbiosis

DISCUSION

CONCLUSIONES

FIGURAS

BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

La construcción de cepas bacterianas con un mayor número de copias de genes específicos, se ha usado ampliamente para fines biotecnológicos. El procedimiento más común consiste en introducir el DNA de interés en un plásmido multicopia. En algunos casos la amplificación génica se ha obtenido por el mecanismo natural de recombinación homóloga, que usualmente ocurre entre secuencias de DNA reiteradas presentes en orientación directa (Anderson, et al.,1997). La amplificación génica se puede inducir, potencialmente, en cualquier parte del genoma mediante la cointegración de un plásmido con la región de interés, en la región homóloga del genoma. Lo anterior resulta en la repetición en sentido directo de la región interrumpida por el vector, y constituye una región amplificable denominada "amplión" (Romero, et al.,1997).

Con el objeto de mejorar la fijación simbiótica de nitrógeno en plantas de alfalfa, se utilizó la amplificación específica de DNA para construir cepas de *Rhizobium meliloti* con un diferente número de copias de cierta región de DNA simbiótico.

Se eligió un fragmento de DNA del regulón *nod* del plásmido simbiótico de *R. meliloti* que contiene: un gen regulador de la nodulación (*nod D1*), los genes estructurales comunes de nodulación (*nod ABC*) y un operón esencial para la fijación de nitrógeno (*nif N*). Dicho fragmento se clonó en un vector suicida, incapaz de replicarse en *Rhizobium*, y se integró en la región homóloga de las cepas silvestres 41 y 1021. Lo anterior resultó en una duplicación directa repetida de dicha región de DNA simbiótico, separada por el vector que porta resistencia a tetraciclina (Tc). Las cepas derivadas con diferente amplificación génica se seleccionaron en mayores concentraciones de Tc.

Se obtuvieron las cepas CFNM101 y CFNM102, derivadas de la cepa silvestre 41, que contienen un promedio de 3 y 6 copias de la región simbiótica, respectivamente; y la cepa CFNM103, derivada de la cepa silvestre 1021 con 2.5 copias promedio.

Además, la misma región se introdujo por conjugación en ambas cepas silvestres en un plásmido multicopia obteniendo los derivados CFNM104 y CFNM105 con un promedio de 7 copias por célula. Se determinó la nodulación, la actividad de nitrogenasa, el crecimiento y el contenido total de nitrógeno de plantas de alfalfa inoculadas en condiciones ambientales controladas, con cada una de las cepas obtenidas. El número de copias de la región simbiótica resultó crítico para determinar el fenotipo simbiótico. En el caso de las cepas con un incremento moderado en el número de copias (CFNM101 y CFNM103), las propiedades simbióticas mejoraron significativamente.

INTRODUCCION

I.- La simbiosis *Rhizobium* - leguminosa

Las especies bacterianas que han sido clasificadas dentro de los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*, son capaces de establecer relaciones especie-específicas con ciertos géneros de plantas leguminosas y formar estructuras bien diferenciadas dentro del cuerpo vegetal, donde se lleva a cabo un complejo proceso bioquímico de reducción y asimilación del nitrógeno atmosférico. Este proceso de fijación simbiótica de nitrógeno tiene lugar en los nódulos radiculares de estas plantas.

La formación de los nódulos es el resultado de procesos de diferenciación celular y es controlada por intercambio de señales moleculares entre los dos organismos: la planta y la bacteria. Este intercambio de señales químicas (diálogo molecular) se da durante las primeras etapas del establecimiento de la simbiosis. La interacción se inicia con un señalamiento químico distante en la rizósfera, las sustancias intercambiadas en esta etapa modulan las primeras respuestas y las condiciones para la iniciación de la simbiosis. En exudados y extractos de raíces de leguminosas fueron identificadas algunas flavonas, isoflavonas y flavononas como las moléculas inductoras para la quimiotaxis bacterial y para la expresión de los genes *nod* en *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*. Los productos de los genes *nod* participan en la biosíntesis y secreción de los factores Nod. Estos factores son capaces de iniciar la formación del nódulo provocando en el hospedero varios tipos de respuesta: deformación de pelos radiculares, división de células corticales, curvatura de pelos radiculares, iniciación del tubo de infección, liberación endocítica e incluso pueden incrementar la producción de compuestos flavonoides (Fig.1). Cuando las células bacterianas se establecen en el primordio nodular, se diferencian a bacteroides los cuales están cubiertos por una membrana peribacterial derivada de la membrana plasmática vegetal, incapaces de retornar al estado bacterial preinfectivo y constituyen

proceso de diferenciación, cambian en su metabolismo que permitirá que sean capaces de transformar nitrógeno atmosférico en amonio. La fijación de nitrógeno en leguminosas se realiza en el interior de las células vegetales -corticales- que ocupan la parte central del nódulo (Brewin, et al.,1992). Los compuestos derivados de la fotosíntesis (carbohidratos) llegan hasta los bacteroides y son fuente de energía de electrones y compuestos orgánicos necesarios para la incorporación del amonio formado. La fijación biológica de nitrógeno es responsable de la mayor transformación de nitrógeno (N_2) en amonio (NH_4). Este amonio es usado por las plantas e indirectamente por los animales.

El establecimiento de las asociaciones *Rhizobium* - leguminosa es muy específica y se da entre bacterias y leguminosas de especies particulares. Dentro de este marco, se pueden distinguir a las bacterias de amplio espectro de hospederos, las cuales nodulan a varias especies vegetales y las bacterias de espectro reducido, cuya infección está restringida a una sola especie vegetal o a unas cuantas (ej. *Rhizobium meliloti*) (Dénarié, et al.,1992).

II.- La simbiosis *Rhizobium meliloti* - alfalfa.

R. meliloti establece relaciones simbióticas con plantas del grupo de las leguminosas, principalmente con especies de los géneros: *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella* (Dénarié, et al.,1992). Esta asociación *Rhizobium* -alfalfa culmina con la formación de un nódulo de tipo indeterminado en donde se distinguen varias zonas histológicamente bien diferenciadas entre sí. La zona apical que corresponde al meristemo nodular libre de bacterias, en seguida una zona prefijadora (infectiva) donde son abundantes los tubos infectivos, luego la zona fijadora de nitrógeno donde se encuentran los bacteroides (que son capaces de transformar nitrógeno atmosférico en amonio) y finalmente una zona de senescencia.

En las bacterias del género *Rhizobium*, los principales genes involucrados en la nodulación y la fijación de nitrógeno se han localizado en grandes plásmidos, llamados plásmidos simbióticos o pSym (Martínez, et al.,1990). *R. meliloti* tiene un

cromosoma de 3540 Kb y dos megaplásmidos, el pSym-a (1340 Kb), que contiene los genes de nodulación, biosíntesis de la nitrogenasa y fijación de nitrógeno: *nod*, *nol*, *nif* y *fix*, y el megaplásmido pSym-b (1700 Kb), en donde se localizan los genes involucrados en la producción de exopolisacáridos y del metabolismo del carbono: genes *exo*, *dct*, *muc*, *lac*, etc. (SanJuan, et al.,1992).

Dentro de los genes *nod* se puede hacer la distinción de dos grupos: los genes comunes y los genes hospedero-específicos (conocidos originalmente como *hsn*). El primer grupo comprende los genes *nodABC*, los cuales se conservan en todos los rhizobia, son genes esenciales para la deformación de pelos radiculares, la infección bacteriana, la inducción de la mitosis en el córtex de la raíz y la formación del nódulo (Schlaman, et al.1992). Se ha demostrado que estos tres genes (*nod ABC*) codifican para tres proteínas (NodA, NodB y NodC), de 196, 217 y 402 residuos de aminoácidos, respectivamente (Török, et al.,1984). Estas proteínas sintetizan el esqueleto de carbono de los factores Nod: lipoquitooligosacáridos derivados de la N-acetil glucosamina (Fig. 2), con diferencias estructurales hospedero-específicas que provocan en la planta diferentes respuestas fisiológicas y morfológicas a nivel radicular: curvatura y deformación de los pelos radiculares, división de células corticales (Nap y Bisseling,1990) e incluso depolarización del potencial transmembranal del pelo radicular de la planta (Ehrhardt, et al.,1992). Estos factores Nod determinan así el espectro de hospederos que una especie bacteriana dada pueda infectar (Fisher y Long, 1992).

En *R. meliloti* se han descrito tri, tetra y pentaquitooligosacáridos con una cadena acilada en el extremo no reductor y un grupo sulfato en el extremo reductor de la molécula (Fig. 2) (Demont, et al.,1994; Roche, et al.1991). *R. meliloti* produce toda una variedad de factores Nod, y los que se describieron primero reciben el nombre de NodRm-IV(S)-inicialmente llamado NodRm1 (Lerouge, et al.,1990). El factor de nodulación NodRm-IV(S)[N-acil-tri-N-acetil- β -1,4-D-glucosamina] es un tetrámero de la N-acetil-D-glucosamina con enlaces β -1,4 entre cada residuo y una sustitución N-

acilada C₁₆:2D^{2,9} en el extremo no reductor con una sustitución sulfatada en el C₆ del azúcar reductor (Dénairé, et al., 1992; Fisher y Long.,1992; Schultze, et al.,1994).-

R. meliloti produce al menos 6 tipos de factores Nod diferentes (Rhijn y Vanderleyden.,1995) entre los cuales hay una pequeña proporción (hasta el 10%) sin el grupo sulfato característico (Schultze, et al.,1994) (Fig. 2).

El segundo grupo, los genes hospedero-específicos, determinan el espectro de hospederos que una especie bacteriana dada pueda nodular. Son los determinantes principales de la especificidad en la infección y la nodulación. Para *R. meliloti* estos genes se encuentran en diferentes operones (Maillet, et al; 1990). Seis genes de nodulación específicos para *R. meliloti* conforman una sola unidad de transcripción de unas 7 Kb: *nodM*, *nodFGHI* y *nodN*. Los genes, *nodM* y *nodN* son necesarios para provocar la deformación de los pelos radiculares (Had). La proteína NodM tiene homología con las amidotrasferasas y más aún con la D-glucosaminsintetasa codificada por el gen *glmS* de *Escherichia coli* .- Se supone que el producto funcional de este gen es una proteína para la síntesis de glucosamina de las subunidades oligosacáridas de los factores Nod. (Baev, et al. 1991).-

Otro grupo de genes específicos para *R. meliloti* conforman el operón *nod FEG* (Maillet, et al., 1990) de aproximadamente 3.1 Kb. Los genes *nodFE*, participan en la síntesis de la cadena acilada de 16 carbonos (C₁₆) y de 18 carbonos (C₁₈) del factor de nodulación de *R. meliloti* (NodRm) y *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* respectivamente (Spaink, 1992), también participan en la formación de dobles enlaces carboxil-conjugados a lo largo de la cadena C₁₆; especifican así proteínas que intervienen en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados C16 (Demont, et al.,1993) (Fig. 2A). Las proteínas Nod F y Nod E tienen homología con la proteína acarreadora de grupos acilo y con la β-cetoacil sintetasa de la sintetasa de ácido graso, respectivamente. Ambas proteínas propuestas en la síntesis de la cadena lipídica de factores Nod (Fisher y Long.,1992). En cuanto al gen *nodG* , se ha demostrado su homología con la ribitol deshidrogenasa, una reductasa de *Klebsiella*

aerogenes (Debellé y Sharma.,1986) y la proteína NodG podría participar en la modificación de la cadena lateral del ácido graso del factor Nod.

Los genes *nodH* y *nodPQ* se encuentran en *R. meliloti*, *Rhizobium tropici* (Mavingui, comunicación personal) y *R. leguminosarum* , y se ha demostrado su participación en la 6-O-sulfatación del extremo reductor de la molécula de glucosamina del NodRm (Roche, et al. 1991) (Fig. 2A). La proteína codificada por el gen *nod P* (Nod P) es una ATP sulfurilasa mientras que Nod Q es una APS (adenosina 5'-fosfosulfato) quinasa, enzimas que catalizan la conversión de ATP y SO_4^{2-} en su forma 3'-fosfoadenosina,5'-fosfosulfato (PAPS), un intermediario en la síntesis de la cisteína. En *R. meliloti*, PAPS es también precursor de los factores Nod sulfatados que causan respuestas simbióticas en hospedero-específicos, tales como la alfalfa (Schwedock y Long.,1992). Las proteínas Nod P y Nod Q juntas forman un complejo donador de grupos sulfato activados (PAPS) para el NodRm. Otra copia de los genes *nodPQ* en el pSym-b tiene función equivalente a la del pSym-a, un nuevo locus definido como *saa* (sulfur amino acid) parece tener actividad para ATP sulfurilasa y APS quinasa (Schwedock y Long,1992). La proteína Nod H es rica en residuos de prolina (8.5%) y tiene cuatro residuos consecutivos de este aminoácido. Encerrados en una región rica en residuos de serina, esta estructura es particularmente rara entre proteínas de organismos procariotes (Debellé y Sharma,1986). Existe cierta homología entre NodH y algunas sulfotransferasas: Schultze, et. al. (1995) reportan para NodH actividad sulfotransferasa *in vitro* y concluyen que los factores Nod son sulfatados después de la síntesis de la estructura primaria del NodRm; se supone que NodH puede transferir específicamente un grupo sulfurilo a partir de un donador de sulfatos activado al C₆ del extremo reductor del tetra o pentámero lipooligosacárido precursor del factor de nodulación (Roche, et al. 1991). De esta manera, los genes *nodFEG* , así como los *nodH* y *nodPQ* intervienen en la definición del espectro de hospederos de *R. meliloti*. Finalmente, otro gen denominado *nodL* también es hospedero-específico y muestra

homología con ciertas acetiltransferasas. Se sugiere que NodL participa en la O-acetilación del factor de nodulación en *R. meliloti* (Baev y Kondorosi,1992). Recientemente se ha reportado que *R. meliloti* puede producir factores de nodulación O-acetilados (Ac-NodRm-1) y esta modificación O-acetilada puede deberse a la acción de Nod L (Baev y Kondorosi,1992).

La mayoría de los genes *nod* antes mencionados no se expresan en ausencia de la planta hospedera, su activación requiere de señales moleculares exudadas por la planta pero también del producto de la expresión constitutiva del gene *nodD*. Todas las especies rhizobiales estudiadas hasta ahora contienen una o varias copias de los llamados genes *nod D*. En *R. meliloti* se han reportado al menos cuatro de estos genes; éstos se han designado *nodD1*, *nodD2*, *nodD3* y *syr M* (Györgypal, et al. 1988; Mulligan y Long,1989; Honma, et al.,1990). Estos genes codifican para activadores transcripcionales de los otros genes *nod*. Los análisis de homología entre estas proteínas han revelado que Nod D es un miembro de la familia Lys R de reguladores de la transcripción (Schlaman, et al. 1992). Muchos actúan como activadores aunque hay otros que son represores. Se trata de proteínas con un motivo 'hélice-vuelta-hélice' (H-T-H) en su extremo amino terminal que se une al DNA con función regulatoria.

El inductor flavonoide se une a Nod D por el extremo COOH-terminal y así induce un cambio conformacional que activa al complejo y permite que la RNA- polimerasa inicie la transcripción. Cuando las bacterias pasan al estado bacteroide, la expresión de los genes *nod* inducibles se detiene a la par de la de los genes *nod D* (Schlaman, et al., 1992).

Las proteínas Nod D tienen diferentes especificidades a los inductores vegetales y ésta es una clave para la infección de las plantas hospederas que determinada especie rhizobial puede nodular.

Además de los genes *nod* (involucrados en el proceso de formación del nódulo) existen otros que participan de manera activa en la fijación simbiótica de nitrógeno.

La conversión del nitrógeno molecular a amonio está catalizada por un complejo enzimático llamado nitrogenasa; este complejo enzimático sólo está presente en algunos organismos procariotes denominados diazótrofos.

Los genes para la fijación de nitrógeno en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son generalmente divididos en 2 grupos: uno de ellos lo conforman todos aquellos genes que tienen homología con los genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*, como es el caso de los genes *nif K*, *nif D* y *nif H* que codifican para las subunidades de la nitrogenasa y de la nitrogenasa reductasa. En el otro grupo están los genes de fijación de nitrógeno que no tienen homología con los *nif* de *K. pneumoniae* e incluyen al gen *fix F* y al operón de los genes *fix A*, *fix B*, *fix C* y *fix X* (Aguilar, et al.,1985 y Earl, et al.,1987). Las cepas mutantes de los genes *nif* y *fix* son capaces de desarrollar nódulos, pero los nódulos no fijan nitrógeno (Nod+Fix-) (Long,1989).

La nitrogenasa está conformada por dos componentes protéicos: el componente I, denominado nitrogenasa, está conformado por dos subunidades "alfa" y dos subunidades "beta" codificadas por los genes *nif D* y *nif K*, respectivamente, y requiere hierro y molibdeno como cofactores; mientras que el componente II, llamado nitrogenasa reductasa, es el producto del gen *nifH* y se encuentra como un dímero de subunidades idénticas que requiere hierro para su actividad. Estos genes fueron caracterizados inicialmente en la enterobacteria *K. pneumoniae*; en este organismo los genes estructurales de la nitrogenasa están organizados en un operón que se transcribe a partir del gen *nifH* hasta *nifK* (MacNeil, et al.,1978; Merrick, et al.,1978; Elmerich, et al.,1978). Otros genes además de *nif HDK* esenciales para producir una nitrogenasa activa son: *nif E* y *nif N* involucrados en la síntesis del cofactor FeMo (Fe-Moco) de la nitrogenasa (Aguilar, et al.,1990). Esta misma organización de los genes estructurales de la nitrogenasa se ha encontrado en varias especies de *Rhizobium*, (Ruvkun, et al.,1982; Corbin, et al.,1982; Ma, et al.,1982; Scott, et al.,1982) y en todos los fijadores simbióticos.. Estos genes fueron localizados utilizando los genes homólogos de *K. pneumoniae* como detectores de hibridización, puesto que las

secuencias que codifican para los tres polipéptidos de la nitrogenasa se encuentran altamente conservadas en todos los organismos fijadores de nitrógeno que se han estudiado hasta el momento. (Ruvkun y Ausubel, 1980).

El proceso de fijación de nitrógeno es altamente costoso por lo que está estrictamente regulado. En el caso de fijadores simbióticos, la principal señal regulatoria es la microaerobiosis captada por una cascada regulatoria, en *R. meliloti* inicialmente, FixL activa a FixJ que a su vez activa la transcripción de *nif A* y *fix K*. *nif A* es el regulador general de los genes de la fijación de nitrógeno. FixK activa la transcripción de *fix N* y tiene efecto inhibitorio sobre sí misma. En la regulación transcripcional de NifA participa un factor sigma específico de la RNAPol (σ^{54}) reconociendo promotores que difieren de los vegetativos, σ^{54} participa en otros procesos como: asimilación de nitrógeno, síntesis de pili y flagelo, degradación de tolueno, etc.

III.- Dinámica del genoma de *Rhizobium*

III.1. Secuencias de DNA reiterado.

Una característica del genoma de *Rhizobium* es la presencia de secuencias de DNA reiterado (Martínez, et al.,1990). En *R. etli* se han descrito tres regiones de elevada homología con los genes estructurales de la nitrogenasa (Quinto, et al.,1982). Dos de estas regiones contienen copias funcionales del operón estructural *nifHDK*, de 5 Kb, en orientación directa (Quinto, et al.,1985). De esta manera, los genes estructurales de la nitrogenasa en *Rhizobium etli*, constituyen uno de los pocos ejemplos de familias multigénicas en bacterias. Recientemente también se ha reportado en *Rhizobium* sp. NGR234 una reiteración del operón *nif HDK* (Freiberg, et al.,1997).

En *R. etli*, Flores, et al.,1987 han estimado la presencia de 700 elementos reiterados, pertenecientes a 200 familias diferentes. Niveles similares de reiteración de DNA fueron también observados para otros miembros de la familia Rhizobiaceae, como *R. meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens*.

En el genoma de diferentes especies de *Rhizobium* las reiteraciones incluyen

secuencias de inserción (ISR1,ISRm1, ISRm2 y RS α) y secuencias con función desconocida (RS β , RSY,RS ϵ) (Priefer, et al, 1981; Wheatcroft y Watson, 1988; Dusha, et al, 1987; Kaluza, et al, 1985; Hahn y Hennecke, 1987). Es importante destacar que el 18% del plásmido simbiótico (pNGR234a) de *Rhizobium* sp. NGR234 comprende secuencias de inserción.- (Freiberg, et al.,1997).

Las secuencias reiteradas pueden bordear a genes funcionales, como en *R. meliloti*, donde un ORF con similitud a IS se encuentra en el extremo 3' de *nod Q1* (Schwedock y Long, 1994), o en *A.zorhizobium caulinodans*, elementos repetidos diferentes bordean a *nod D* (Geelen, et al.,1995). Se ha encontrado también en *R. leguminosarum* bv. *viciae* una estructura parecida a un transposón, el cual codifica para un sistema de restricción-modificación (Rochepeau, et al.,1997).

En ocasiones, las secuencias repetidas incluyen regiones regulatorias, (aprox. 300 pb); dos de ellas llevan promotores de genes *nif* (Better, et al., 1983), y el locus *mos*, que codifica para genes requeridos para síntesis de una opina, que porta también una reiteración de la región regulatoria (Murphy, et al., 1988). Un caso similar al anterior, revela la existencia de reiteración de la región promotora de *nifHDK* y en ocasiones del amino terminal de *nifH* (Scott, et al, 1984; Watson y Schofield, 1985).

Earl, et al.,1987 al estudiar el operón *fix ABCX* (relacionado al transporte de electrones), localizaron una duplicación en el extremo 5' del operón, que incluye la región regulatoria y 32 codones del gene *fix A*. Rostas, et al.,1986 reportaron originalmente la existencia de tres cajas *nod* en *R. meliloti*, estos datos se han extendido con el hallazgo de otras cinco cajas *nod* (Baev, 1991; Baev y Kondorosi, 1992; Plazenet, et al.,1995, Barnett, et al.,1995, Balleza, 1998) involucradas en la regulación de genes de nodulación.

Finalmente, hay genes reiterados con funciones relacionadas pero no idénticas. Schwedock y Long, 1992 reportaron al par *nod PQ -saa*, donde *nod PQ* está involucrado en la sulfatación de un factor de nodulación, mientras *saa* participa en el

paso de sulfatación para la biosíntesis de cisteína y metionina. El par *nodM-glmS*, donde *nodM* sintetiza la glucosamina necesaria para la biosíntesis del factor *nod*, mientras *glmS* elabora la glucosamina requerida por función celular (Marie, et al.,1992).

Una característica importante de estas secuencias es que su distribución no es al azar, unas se encuentran localizadas sólo en plásmidos y otras son exclusivas del cromosoma (sólo los genes *fla* de *R. meliloti* están arreglados en tandem). Muchas de estas secuencias se presentan usualmente en una copia en otros organismos; de hecho, solamente en *Rhizobium* se ha detectado reiteración de los genes *fts Z*, *gro EL* y *rpo H* (Fischer, et al.,1993; Margolin y Long, 1994; Narberhaus, et al.,1997; Rusanganwa y Gupta, 1993).

III.2. Amplificación génica.

Debido a la presencia de secuencias reiteradas, el genoma de algunas cepas de *Rhizobium* está sujeto a frecuentes rearrreglos genómicos que constituyen una causa importante de variabilidad en la población.

Recientemente se ha propuesto un modelo dinámico del genoma de *Rhizobium* (Palacios, et al.,1995). Las unidades básicas de este modelo se han denominado amplicones. Los amplicones son regiones específicas de DNA que tienen el potencial para ser amplificadas o deletadas como una unidad. Cada amplicón se encuentra limitado por secuencias de DNA repetido que se orientan de manera directa entre sí (Fig. 3). Los fenómenos de recombinación homóloga entre estas secuencias repetidas, tienen como resultado la duplicación o delección del amplicón completo (Anderson y Roth, 1997). Las frecuencias de duplicación varían entre diferentes amplicones y sus valores dependerán principalmente de la longitud y el grado de homología de las regiones repetidas que limitan cada amplicón.

Se han identificado amplicones funcionales tanto en el cromosoma como en grandes plásmidos (Flores, et al.,1993; Romero, et al.,1995; Stepkowski, et al.,1993; Mavingui, et al.,1998). El primer amplicón que ha sido descrito para *Rhizobium* corresponde a

una región *nod-nif* del pSym de *R. etli* (Romero, et al.,1991). Este amplicón mide 120 Kb y sus secuencias repetidas directas de 5 Kb, corresponden a los operones funcionales de la nitrogenasa *nifHDK* (Quinto, et al.,1982). Actualmente, además de este amplicón, se han descrito otros tres en la misma cepa, estos cuatro amplicones se encuentran sobrelapados y se localizan en una región del pSym que es rica en genes de nodulación y de fijación de nitrógeno (Romero, et al.,1995). Estos amplicones son muy variados y sus dimensiones fluctúan entre 10 a más de 100 Kb (Flores, et al.,1993). En *R. leguminosarum* bv. *trifolii* también se han detectado amplicones (Stepkowski, et al.,1993). Mavingui, et al.,1997 han generado amplicones artificiales al azar (RDA) en *R. tropici* y a su vez en la misma especie han estudiado un amplicón *nod-nif* de 60 Kb (Mavingui, et al.,1998). Mediante el análisis de secuencias nucleotídicas, se han identificado secuencias con alta homología (reiteraciones) y teóricamente se ha propuesto la presencia de ocho amplicones en el pSym de *R. spp* NGR234 (Balleza,1998).

Es importante mencionar que la organización de las regiones amplificadas está en tandem, por lo que son altamente reactivas en términos recombinatorios, ya que incrementan o disminuyen el nivel de amplificación y, eventualmente, pueden regresar al estado inicial no amplificado.

Como consecuencia de una actividad recombinatoria alta, las regiones amplificadas liberan continuamente estructuras circulares que contienen monómeros o multímeros de la secuencia del amplicón original. Generalmente estas estructuras circulares no contienen orígenes de duplicación, por lo que su permanencia dentro de una población bacteriana es temporal. Sin embargo, estas unidades circulares pueden participar también en fenómenos recombinatorios posteriores y generar nuevos rearrreglos genómicos.

IV. Manipulación del genoma por amplificación génica

Entre los rearrreglos genómicos destaca por su interés biotecnológico la amplificación

génica. El papel de la amplificación génica puede manifestarse como cierta ventaja adaptativa ante diversas condiciones ambientales. Es probable que la implicación más importante de la amplificación génica sea que incrementa la potencialidad del genoma para reorganizar su material genético sin alterar la estructura global del mismo.

El incremento en el número de copias de genes específicos o de regiones genómicas se puede seleccionar o inducir utilizando diversos enfoques experimentales: **1.-** Por la introducción de una región de DNA de interés en un plásmido multicopia.- **2.-** Por amplificación a través de mecanismos naturales de recombinación homóloga, que ocurren entre secuencias reiteradas presentes en orientación directa, (Anderson y Roth, 1997) que al recombinar conducen a una duplicación y posteriormente a una amplificación de la región de interés (Palacios, et al.,1993). En *Rhizobium* se han empleado ciertos elementos genéticos como es el caso del cassette GDYN1 (Romero, et al.,1991), mediante el cual se puede llevar a cabo la selección positiva de estos eventos de amplificación. El elemento genético GDYN1 es un sistema capaz de seleccionar positivamente diferentes tipos de rearrreglos genómicos.- **3.-** Amplificación inducida experimentalmente (amplificación *in situ*), mediante el uso de herramientas genéticas que permiten obtener una estructura tal que posea secuencias repetidas capaces de recombinar y producir rearrreglos. Como herramienta genética para inducir estas amplificaciones *in situ* se han diseñado plásmidos “integrativos” (Dowds, et al.,1988) . Este tipo de amplificación puede ser: **a)** al azar (RDA), cuando la secuencia de DNA y la organización de los genes es desconocida (Mavingui, et al.,1997) y **b)** específica (SDA), cuando la regulación y la organización de los genes involucrados en una función son conocidos (estrategia utilizada en este estudio).

Recientemente diferentes grupos del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, tales como los de los Dres. R. Palacios, D. Romero y G. Davila, han realizado investigaciones relevantes sobre la amplificación génica: natural e inducida, en bacterias del género *Rhizobium*..

realizado investigaciones relevantes sobre la amplificación génica: natural e inducida, en bacterias del género *Rhizobium*..

En este trabajo se eligió la estrategia de amplificación inducida de una región específica que resulta interesante porque porta genes involucrados en la simbiosis *Rhizobium meliloti* -alfalfa. La amplificación génica inducida de estos genes involucrados en la nodulación y fijación de nitrógeno pudiera resultar en mejorar las capacidades simbióticas de *Rhizobium* , como se ejemplificará en el presente estudio.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Realizar la amplificación génica de una región elegida del regulón *nod* de *R. meliloti* para generar cepas con distinto número de copias, mediante el procedimiento de amplificación específica de DNA.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Generar cepas con distinto número de copias de la región específica (8.5 Kb) del regulón *nod* de *R. meliloti* que incluye el gen *nifN*, un ORF (ORF110) y los genes *nodD1* y *nodABC*.

2.- Evaluar el efecto de las cepas obtenidas de *R. meliloti* en la simbiosis con plantas de alfalfa; determinando los siguientes parámetros:

- a).- Cinética de nodulación
- b).- Actividad enzimática de la nitrogenasa
- c).- Crecimiento de la planta
- d).- Contenido de nitrógeno total en el follaje.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir estos objetivos se manipuló el número de copias del fragmento de DNA (8.5 Kb) usando dos estrategias: **1)** una cointegración y amplificación en la región homóloga del pSym-a de *R. meliloti* 41 y 1021 y **2)** la introducción de un plásmido multicopia portando la región en estudio.

Las cepas derivadas de *R. meliloti* (41 y 1021) con diferentes amplificaciones fueron utilizadas como inoculantes de plantas de alfalfa para analizar su efecto en la simbiosis.

Se determinó el fenotipo simbiótico de estas plantas crecidas en macetas con vermiculita en cuartos de cultivo bajo condiciones controladas (temperatura, fotoperiodo, humedad). Se analizó: la cinética y capacidad de nodulación, la actividad de nitrogenasa, el crecimiento y el contenido total de nitrógeno en el follaje en plantas inoculadas con las cepas derivadas de *R. meliloti* con las inoculadas con cepas silvestres y con plantas no inoculadas (regadas sin nitrógeno).

METODOS

I. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS UTILIZADOS.

Las cepas de *R. meliloti* y los plásmidos utilizados y generados en este estudio se muestran en la Tabla No. 1

II. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pCH1.

II.1. Purificación de DNA plasmídico.

Para construir el plásmido pCH1 (Fig. 5) fue necesario primero extraer DNA plasmídico del pSUP202 (vector suicida) y del pKSK5 (plásmido que contiene los genes de interés). El DNA plasmídico se purificó por el método de lisis alcalina (Maniatis, et al., 1982).

II.2. Restricción y desfosforilación del DNA.

De cada uno de los plásmidos, se digirió ± 100 ng de DNA (3 μ l) usando 10 U de la endonucleasa *Eco* R1 (Amersham Life Science-10 U/ μ l), ésto debido a que el fragmento de interés que está en el plásmido pKSK5 está flanqueado por sitios *Eco* R1 y será clonado en el pSUP202 en el sitio *Eco* R1.

Una vez digerido el DNA plasmídico del vector pSUP202 se necesita desfosforilar sus extremos 5'-P para evitar que se vuelvan a ligar y así aumentan las posibilidades de que el fragmento de interés se ligue en el vector de clonación desfosforilado. Para desfosforilar el DNA se utilizó la enzima fosfatasa CIAP (Alkaline Phosphatase-20 U/ μ l) en una proporción de 1 μ l de enzima por 99 μ l de H₂O, y se mezcló con ± 170 ng del DNA (5 μ l) previamente digerido.

II.3. Ligación

Para la reacción de ligación se transfirieron ± 100 ng de DNA (3 μ l) plasmídico de pSUP202 previamente desfosforilado, agregando 0.4 μ g de DNA inserto (9 μ l) (fragmento de 8.5 Kb que porta los genes de interés). Se calentó la mezcla a 70°C por 10 minutos para inactivar la enzima de restricción utilizada en la digestión y después se agregaron 2 μ l de buffer de ligasa y 1 U de T4 DNA ligasa (1 U/ μ l) diluyendo con

en cajas de petri con los antibióticos de selección.

II.4. Análisis de las clonas obtenidas.

Para verificar que la ligación se había llevado a cabo y teníamos el plásmido pCH1, se purificó DNA plasmídico de las colonias (Tc^R y Cm^S) y se digirió con 10 U de la enzima de restricción *Bam* H1 (Amersham Life Science-10 U/ μ l). Esta enzima corta el plásmido en dos sitios generando dos fragmentos de 7.9 Kb y 8.8 Kb (Fig. 5). Las muestras de DNA digerido se corrieron en geles de agarosa al 0.8% disolviendo en buffer de acetatos ó buffer de boratos 1X. Para visualizar las bandas de DNA y comprobar la existencia del plásmido pCH1 se tiñen los geles 5-10 minutos con Bromuro de Etidio, un agente intercalante que se fija entre las dos hebras de DNA y fluoresce con luz UV (Williams y Patient.,1990) y se observa en una cámara de luz UV "Eagle-Eye" (STRATAGENE).

III. CONSTRUCCION DE CEPAS MODIFICADAS DE *R. meliloti* DERIVADAS DE LAS CEPAS SILVESTRES 41 Y 1021.

III.1. Selección de cepas con el fragmento *Eco* RI cointegrado.

Para lograr la integración del plasmido pCH1 en el genoma de *R. melilotii* 41 y 1021 se realizó una transconjugación de *E. coli* DH5 α pCH1 (cepa donadora) a *R. meliloti* 41 y 1021 (cepa receptora) utilizando *E. coli* HB101 (pRK2013) como auxiliar para la transferencia del plásmido (Tabla I). Las distintas cepas fueron mezcladas en proporciones 1:2:1 respectivamente, sembrando por gota en cajas con medio sin selección y cultivadas a 30°C durante 18 horas. Trascurrido el tiempo de incubación, se adicionó 1 ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - Tween 40 y se resuspendieron las células y a partir de esta resuspensión se hicieron diluciones seriadas de 10^0 - 10^{-7} , plateando 100 μ L de cada dilución en los medios de selección para la cepa 41 fue en medio mínimo (Baev, et al.,1992) y espectinomicina (Sp^{100}) y tetraciclina (Tc^5) y para la cepa 1021 medio mínimo, espectinomicina (Sp^{50}) y tetraciclina (Tc^5). El uso de este medio mínimo evita que crezcan colonias de *E. coli*.

III.2. Comprobación de la cointegración del fragmento *EcoRI* en el genoma de *R. meliloti*.

Para confirmar la cointegración se hizo un perfil plasmídico mediante la técnica de Eckhardt (Eckhardt.,1978) y un Southern blot (Southern.,1975), utilizando como sondas radiactivas el plásmido pSUP202 y el producto de PCR *nod A*. Para llevar a cabo la hibridización se purificó primero DNA génomico de *R. meliloti* 41/1021 (Adaptada de Maniatis, et al., 1982). El DNA obtenido se digirió con la enzima de restricción *Kpn* 1 (Amersham Life Science) que corta en un sitio único al plásmido pCH1 (Fig. 5), y se transfirió a filtros para su posterior hibridización.

Para comprobar la existencia del fragmento de DNA dentro del genoma de *R. meliloti* 41/1021 se hibridaron muestras de su DNA ya digerido (*Kpn* I) con sondas marcadas radiactivamente utilizando (α -³²P)dCTP mediante el protocolo RPL (Random Primer Labelling) siguiendo las indicaciones de Amersham Ltd. Para marcar radiactivamente las sondas de los plásmidos pSUP202 ó pCH1 se tomaron 180 ng (5 μ l) de cada uno y se digirieron con *Bam* H1 ó *Eco* R1 respectivamente. Además se usó una sonda producto de PCR intragénico del gen *nodA*. Cada muestra se lleva a 45 μ l con agua, la mezcla se desnaturaliza 5 min a 95°C, se centrifuga 20 seg. y se transfiere cada muestra a un tubo con los primeros, se mezcla y se agregan 5 μ l de marca (dNTP32) a cada tubo. Esta mezcla se somete a 37°C por 10 min, dejando inmediatamente en hielo y centrifugando nuevamente para bajar la mezcla, y luego introducirla en los tubos de hibridización Hybond.

Para la prehibridización se colocaron los filtros en donde se transfirió el DNA de *R. meliloti*, en tubos a los que se les añadió 15 ml de solución amortiguadora de hibridización rápida (Amersham, Life Science) y se mantuvo en rotación a 65°C durante 2 horas. Los tubos con los filtros prehibridizados se dejaron enfriar 10 min. Trascurrido este tiempo, se adicionó la sonda y se dejó en rotación a 65°C durante 12 horas. Posteriormente se desechó el liquido de hibridización, se enjuagaron los filtros

con 50 ml de SSC2X + SDS 0.1% y se lavó durante 15 min. en rotación y a temperatura ambiente con esta misma solución. Se hicieron 3 lavados de 30 min. a 55°C y en rotación con SSC 0.1X + SDS 0.1% y finalmente, se lavó 1 vez durante 15 min. a 55°C y en rotación con SSC 0.1X. Los filtros se secaron en un horno a 55°C durante 10 min, se pegaron en cuadros de cartulina, se cubrieron con Kleen-pack y se fijaron en un cassette para autorradiografía, colocando sobre ellos una película fotográfica (Kodak X-Omat KXK-1), exponiéndolos por 2 días a -70°C al cabo de los cuales la placa se reveló en condiciones de oscuridad

III.3. SELECCION DE CEPAS DE *R. meliloti* CON MAYOR NUMERO DE COPIAS DEL FRAGMENTO *Eco* R1 COINTEGRADO.

La amplificación génica puede inducirse experimentalmente (amplificación *in situ*) mediante el uso de herramientas genéticas que permiten obtener una estructura tal que posea secuencias repetidas directas capaces de recombinar y producir rearrreglos: amplificación de los genes involucrados (Fig. 6). Los elementos genéticos utilizados tienen genes de resistencia a antibióticos y permiten seleccionar cepas con mayor número de copias al aumentar la concentración del antibiótico.

La estrategia para seleccionar cepas con diferente número de copias del fragmento *Eco* R1 que porta los genes de interés se consigue incubando las cepas que llevan cointegrado el pCH1 con mayor concentración de Tc. Para esto, primero se incubaron en medio PY líquido (Noel, et al., 1984) sin el antibiótico de selección (Tc). Una vez que crecieron en estas condiciones, se procedió a hacer las diluciones correspondientes (0.1ml de la solución concentrada en 0.9 ml de MgSO₄-Tween de 10⁰-10⁷). De estas diluciones se pusieron gotas de 25 µl en cajas de petri con PY sólido, adicionando concentraciones crecientes de tetraciclina 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70 y 100.

De esta colección de cepas crecidas a distintas concentraciones de tetraciclina se seleccionaron cuatro colonias (2 para la cepa 41 y 2 para la 1021) y se determinó el

número de copias en cada una. Estas nuevas colonias se resembraron otra vez en medios PY sólido a distintas concentraciones de Tc 15, 20, 30, 40, 50 y 100 para tratar de lograr mayor amplificación.

Con la finalidad de tener una colección de cepas que presentaran distintos niveles de amplificación, se obtuvieron cepas con un plásmido multicopia, con el mismo fragmento *Eco* RI (8.5 Kb), seleccionando transconjugantes Tc20 resistentes derivadas de *R. meliloti* 41 (CFNM104) y 1021(CFNM105).

Para continuar este trabajo se escogieron dos cepas derivadas de *R. meliloti* 41 con distinto nivel de amplificación, la CFNM101 (3 copias) y CFNM102 (6 copias), y una cepa de *R meliloti* 1021, la CFNM103 (con 2.5 copias) (Tabla I) (ver resultados).

III.4. Análisis densitométrico para determinar el número de copias en cada cepa.

Para cuantificar el número de copias de la región amplificada generadas en cada cepa se hizo un análisis densitométrico. La intensidad de las señales de hibridización detectadas en una placa de autorradiografía se visualizó como bandas y depende de la cantidad de marca hibridizada en la secuencia específica y éstas, a su vez, son un reflejo del número de copias de la banda en el genoma.

Para llevar a cabo este análisis, las muestras de DNA obtenidas de las cepas con distintos niveles de amplificación fueron digeridas con la enzima de restricción Kpn1 e hibridizadas con el producto de PCR *nod A*. La intensidad de las bandas es una medida indirecta del número de copias existentes en la región amplificada -*nod D1-ABC*- con respecto a un gen que se encuentra como una sola copia en el genoma *nod A*.

Para evaluar el número de copias de una banda con respecto a otras bandas en un carril de una autorradiografía se utilizó un sistema de análisis de imágenes de geles QGEL, versión 2.72 (Quanti Gel Co).

IV. DETERMINACION DEL FENOTIPO SIMBIOTICO.

IV.1. Germinación, crecimiento y mantenimiento de las plantas de alfalfa.

Para este trabajo se utilizaron semillas de alfalfa (*Medicago sativa* cv. Iriquois).

La esterilización de las semillas se hizo sumergiéndolas durante 5 min. con una solución diluída de blanqueador comercial (cloralex) al 20% para posteriormente ser lavadas con agua esteril 4 o 5 veces (para quitar el exceso de cloralex) y se dejaron en agua por 18 horas antes de sembrarlas e inocularlas en bolsas de papel o en macetas.

Para los experimentos de cinética de nodulación se utilizó el sistema de bolsas de papel 12.5 cm x 15.5 cm, (Seed-Pack Growth Pouch, Vaughans Seed Company. Downers Grove, IL. USA) 10 semillas por bolsa con el hilo hacia abajo y se regaron agregando 20 ml de medio nutritivo Jensen (Vincent, J.M.1970) se incubaron durante 4 días en cuarto de cultivo a 29°C para que germinaran e inocularlas después (Fig. 7A).

Para otros experimentos se germinaron semillas de alfalfa en cajas de petri con papel filtro húmedo y estéril, y se mantuvieron en completa oscuridad por 24 horas y posteriormente se incubaron a una temperatura de 30°C por 4 días. Ya germinadas se transplantaron a macetas (20 cm x 16 cm) con vermiculita, 20 semillas/maceta antes de inocularlas (Fig. 7B)

Las plantas fueron inoculadas con las cepas de *R. meliloti* con amplificación génica obtenidas y con las cepas silvestres 41 y 1021 (Tabla I). El inóculo bacterial que fue preparado a partir de un cultivo crecido durante toda la noche en PY líquido con el antibiótico apropiado. El cultivo se centrifugó, se lavó con MgSO₄ 10 mM y se ajustó a una D.O.₅₄₀ de 0.5. Se inocularon con 1 ml de inóculo por planta lo que equivale a inocular aproximadamente 10⁹ células por planta. Se incubaron a 21°C, 80% de humedad, con un fotoperíodo de 12 horas y fueron regadas con medio líquido Jensen (Vincent, J.M. 1970) cada semana durante 40 días (bolsas) o 60 días (macetas).

IV.2. Parámetros evaluados en las plantas inoculadas con las distintas cepas modificadas de *R. meliloti*.

Para determinar la cinética de nodulación de las plantas de alfalfa inoculadas con cada una de las cepas de *R. meliloti* se contaron los nódulos hasta 40 días post-inoculación cada tercer día, a las plantas sembradas en bolsas (Fig. 7A). Se evaluaron un total de 100 plantas/condición para cada cepa, calculando su respectiva media y error estándar.

Las plantas que fueron inoculadas en macetas se utilizaron para evaluar los otros parámetros: 1.-Capacidad de nodulación, 2.- Actividad de nitrogenasa, 3.- Crecimiento (peso seco) y 4.- Contenido de nitrógeno total, a los 60 días post-inoculación. Se analizaron 35 plantas en total para cada cepa, calculando su media y desviación estándar.

La nodulación se determinó contando los nódulos formados por planta a los 60 días post-inoculación.

La actividad de la nitrogenasa puede ser determinada midiendo directamente el amonio producto de la fijación o por medidas indirectas, las cuales están basadas en la habilidad de la nitrogenasa para reducir un número de sustratos diferentes al nitrógeno molecular. Sustratos tales como el óxido nitroso (N_2O), azida (N_3^-), cianida (CN^-) e isocianida (NC^-) son también reducidos por la nitrogenasa, y los requerimientos de ATP y poder reductante son muy similares a los de la fijación de nitrógeno. La reducción de protones a hidrógeno molecular ha sido usada también para medir la actividad de nitrogenasa. Además, la nitrogenasa puede también reducir el acetileno a etileno, ambos gases son rápidamente medidos a muy baja concentración por la técnica de cromatografía de gases. Como consecuencia de su sensibilidad, simplicidad y rapidez de uso, el ensayo de reducción de acetileno vino a ser el procedimiento estandar para medir actividad de nitrogenasa en muchos laboratorios (Hardy, et al., 1968).

Por lo tanto, para evaluar la actividad enzimática de la nitrogenasa en este trabajo se realizó midiendo la reducción de acetileno a etileno por la técnica de cromatografía de

gases. Las plantas fueron cosechadas al azar y colocadas en frascos (5 plantas/frasco) herméticamente sellados, de cada frasco se extrajo con una jeringa insulínica 0.5 ml de aire y se les inyectaron 0.5 ml de acetileno (tiempo0). Posteriormente se tomaron muestras de 0.4 ml a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min.) y se cuantificó el etileno sintetizado en un cromatógrafo de gases (Varian Gas Chromatograph 3300). La actividad de nitrogenasa se determinó en 10 muestras para cada condición y se obtuvo la media y la desviación estándar.

El crecimiento de las plantas se determinó en base a su peso seco. Se separó la raíz del follaje de cada planta, se colocaron en frascos separados, se secaron en una estufa a 65°C por una semana, se pesaron las muestras y se determinó el peso seco del follaje y de la raíz.

Las muestras secas de follaje se utilizaron para determinar el contenido de nitrógeno total utilizando un analizador de nitrógeno(modelo ANTEK 7000; Antek Instruments, Inc. Houston Tx. USA) equipado con un horno de temperatura programable modelo 737 controlado por un microprocesador 7000 y fueron cuantificadas por quimioluminiscencia. El contenido de nitrógeno es dado en miligramos de nitrógeno por miligramo de peso seco (Cevallos, et al.,1996).

Con todos los datos generados en los distintos análisis antes mencionados se hizo una prueba estadística de “t” de STUDENT con ayuda del programa Sigma Plot. Se compararon los resultados obtenidos para los diferentes parámetros en cada una de las cepas utilizadas para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las cepas amplificadas y las silvestres.

IV.3. Estabilidad de la amplificación durante la simbiosis.

Las bacterias del nódulo fueron substraídas de manera mecánica macerándolas (esterilizando previamente la superficie del mismo) sobre placas de cultivo. Se purificó DNA génomico de las colonias bacteriales obtenidas, se digirió con la enzima de restricción *Kpn* 1 y las muestras se hibridizaron con el producto de PCR intragénico *nod A*. Se cuantificó el número de copias de la región amplificada generadas en cada

restricción *Kpn* 1 y las muestras se hibridaron con el producto de PCR intragénico *nod* A. Se cuantificó el número de copias de la región amplificada generadas en cada cepa por medio de un análisis densitométrico.

RESULTADOS

I. OBTENCION DE CEPAS DE *R. meliloti* CON MAYOR NUMERO DE COPIAS DE DNA DE UNA REGION ESPECIFICA.

La región *nod* de *R. meliloti* 41 que se eligió para aumentar el número de copias, fue un fragmento de 8.5 Kb flanqueado por sitios *Eco* R1. Los elementos incluidos que parecieron interesantes fueron: el gen regulatorio *nod* D1 (activador transcripcional de otros operones *nod*), los genes *nod* comunes *ABC* (sintetizan la estructura primaria del factor de nodulación) la *nod* box n1, un operón esencial para la fijación de nitrógeno compuesto por el gen *nif* N (llamado originalmente *fix* F) y un ORF (ORF110) que codifica para una proteína con una función desconocida (Fig. 4). Este fragmento fue purificado del plásmido pKSK5 (Kondorosi, et al.,1984) y clonado en el sitio *Eco* R1 del pSUP202 (Simon, et al.,1983) obteniendo así el plásmido pCH1 de 17 Kb (Fig. 5). Este plásmido presentó un origen de replicación que fue activo en *E. coli* pero no en *Rhizobium*, un sitio *mob* y dos marcadores de resistencia: tetraciclina (Tc) y ampicilina (Ap).

Este plásmido, que porta una secuencia homóloga de *R. meliloti*, se utilizó para integrarlo, vía una recombinación homóloga, al pSym-a.- La estrategia que se usó fue realizar una transconjugación del plásmido pCH1 a *R. meliloti* utilizando como auxiliar el plásmido PRK2013 que cuenta con genes *tra*, necesarios para la transferencia del pCH1. Las colonias que cointegraron el plásmido en la región homóloga del pSym-a de *R. meliloti* fueron Sp^R (marcador de *R. meliloti*), Tc^R (marcador del plásmido) y Cm^S (gen interrumpido por la clonación de los genes en el sitio *Eco*R1). La estructura resultante fue una repetición directa de la región de 8.5 Kb separada por el vector pSUP202 (Fig. 6).

Para confirmar la cointegración del pCH1 en *R. meliloti* 41 y 1021 se hicieron los siguientes experimentos: 1.- se eligieron 18 colonias transconjugantes derivadas de cada cepa, a las cuales se les extrajo DNA plasmídico y se corroboró que fuesen

de migración indicó que todas las colonias seleccionadas (Sp^{RTcR}) correspondieron a cepas de *R. meliloti* 41 (Fig. 8A) y 1021 (Fig. 8B), al visualizarse dos bandas que corresponden a los megaplásmidos: pSym-a (1340 Kb) y pSym-b (1700 Kb) de *R. meliloti* 41 y pSym-a (1400 Kb) y pSym-b (1600 Kb) de *R. meliloti* 1021.

2.- Otra forma de evidenciar la integración del plásmido pCH1, fue elegir de las 18 colonias anteriores sólo 7 de cada cepa, extraer DNA total de cada una, digerir con la enzima de restricción Kpn1 (corta al plásmido pCH1 en un sitio) y transferirlo a membranas de nylon para la hibridización utilizando como sonda radiactiva el plásmido pSUP202 (Fig. 9).

El análisis de hibridización de las muestras de DNA total reveló que el pSUP202 se encuentra integrado en el genoma de *R. meliloti* 41 (Fig. 9A) y 1021 (Fig. 9B) debido a que se observó una sola banda en las colonias transformantes y no en la cepa silvestre ya que ésta no tiene cointegrado el plásmido pSUP202. Este plásmido se cointegró en el genoma de *R. meliloti* dado que no pudo permanecer libre porque posee un origen de duplicación que es ajeno a la maquinaria duplicativa del hospedero.

A partir de esas cepas que tienen cointegrado el plásmido y que fueron seleccionadas en un medio con MM Tc⁵, Sp¹⁰⁰ y Sp⁵⁰, se buscó aumentar el número de copias de la región simbiótica incrementando los niveles de tetraciclina, marcador de selección del vector pSUP202 al que es sensible *R. meliloti*.

Una estrategia similar fue empleada previamente por Romero, et al.,1991. En ese trabajo se aislaron cepas con amplificaciones, utilizando como marcador de selección Kanamicina.

En el presente trabajo las cepas derivadas de *R. meliloti* 41 y 1021 se seleccionaron en tc⁵, 7.5, 15, 20 y 30 µg/ml y se analizaron colonias obtenidas en cada condición como sigue: Se purificó DNA total de cada colonia, se digirió con la enzima de restricción *Kpn* 1 y se sometió a electroforesis en geles de agarosa. El fragmento *Eco* RI contiene un sitio único *Kpn* 1 que está "upstream" del gen *nodD1*, mientras que el

vector del plásmido pCH1 no contiene ningún sitio *Kpn* 1 (Figs. 4 y 5). Los geles se transfirieron e hibridizaron usando como sonda un producto de PCR intragénico de *R.melliloti nodA*. En las cepas silvestres se esperaba un fragmento de 10 Kb que se denominó (K1). Las cepas con amplificaciones debían mostrar el mismo fragmento (K1) que la cepa silvestre y un nuevo fragmento recombinante de 17 Kb denominado (K2), cuya intensidad se espera que aumente de manera proporcional al número de copias amplificadas (Fig.6). La forma de cuantificar el nivel de amplificación fue haciendo un análisis densitométrico a la autorradiografía de estas colonias.

Las intensidades de las bandas K1 y K2 se determinaron y se tomó la relación de intensidades K1:K2 como una medida del número de copias existentes en la región amplificada con respecto a un gen que se encuentra en una sola copia en el genoma - *nodA*-. El estudio reveló que todas las cepas derivadas de *R. melliloti* 41 crecidas en distintas concentraciones de tc mostraban sólo dos niveles de amplificación diferentes.- Por lo que se seleccionaron las cepas: CFNM101 en tc5 µg/ml con 3 copias (1:2) y CFNM102 en tc30 µg/ml con 6 copias (1:5).- En el caso de *R. melliloti* 1021 todas las cepas obtenidas en distintas concentraciones de tc tenían el mismo nivel de amplificación.- Se seleccionó sólo una cepa CFNM103 con 2.5 (1:1.5) copias del gen *nodA* (Fig. 10).

Adicionalmente se obtuvieron por conjugación dos cepas CFNM104 y CFNM105 derivadas de *R. melliloti* 41 y 1021 las cuales tienen el plásmido pKSK5 con el mismo fragmento *Eco* R1 de 8.5 Kb, sólo que en este caso, está clonado en un plásmido multicopia (pRK 290) (Ditta, et al.,1980). Estas colonias muestran el fragmento silvestre (K1) y un fragmento de 28.5 Kb que corresponde al pKSK5 linearizado (Fig. 10).

II. DETERMINACION DEL FENOTIPO SIMBIOTICO.

Las distintas cepas generadas portando diferentes amplificaciones de la región simbiótica fueron utilizadas como inoculantes de plantas de alfalfa para evaluar

mediante diversos parámetros la eficiencia de la simbiosis *Rhizobium* -alfalfa.

En primer lugar se determinó la capacidad de las diferentes cepas de *R. meliloti* con distinto nivel de amplificación, para nodular plantas de alfalfa en el sistema de bolsas de cultivo (Fig. 7A); las curvas de cinética de nodulación se presentan en la Figura 11.

La cepa CFNM101 muestra un significativo ($p \leq 0.03$) incremento en la nodulación, mientras que las cepas CFNM102, CFNM104 y CFNM105, muestran un similar y significativo ($p \leq 0.02$) decremento en la nodulación en comparación con las cepas silvestres (Fig. 11A). La cepa CFNM103 muestra un incremento significativo ($p \leq 0.01$) en la nodulación con respecto a la cepa silvestre 1021 en estadíos tardíos de la simbiosis (Fig. 11B).

En el siguiente experimento se determinó el fenotipo simbiótico de plantas de alfalfa inoculadas en macetas con vermiculita, que es un sistema más natural para su crecimiento óptimo bajo condiciones controladas (Fig. 7B). También se sembraron plantas control que no fueron inoculadas y regadas con solución nutritiva sin nitrógeno.

En este experimento las plantas inoculadas con las cepas CFNM101 y CFNM103, mostraron un incremento en la nodulación (2.2-2.5 veces), mientras que las plantas de alfalfa inoculadas con CFNM102, CFNM104 y CFNM105, mostraron una disminución significativa ($p \leq 0.01$) en el número de nódulos (2.7-3 veces), con respecto a las cepas silvestres. Las plantas control no presentaron nodulación. (Fig. 12)

Para evaluar la fijación de nitrógeno se midió la actividad de nitrogenasa de las plantas inoculadas con las cepas portando distintos niveles de amplificación. La actividad de reducción de acetileno en plantas inoculadas con las cepas CFNM101 y CFNM103 se incrementó significativamente ($p \leq 0.01$) de 2.6-2.8 veces por planta, mientras que las que fueron inoculadas con las cepas CFNM102, CFNM104 y CFNM105 presentaron una disminución de 2.2 veces en su actividad con respecto a

la cepa silvestre. Las plantas control no registraron actividad de nitrógenasa. (Fig. 13) La asimilación del nitrógeno fijado por parte de la planta redundará en su desarrollo y en el contenido de nitrógeno en su follaje. El desarrollo de las plantas se evaluó determinando el peso seco (Figs. 14 y 15). Las plantas inoculadas con las cepas CFNM101 y CFNM103 mostraron un incremento significativo ($p \leq 0.01$) de dos veces en el peso seco del follaje (Fig. 14) y de la raíz (Fig. 15), en comparación a las plantas inoculadas con las cepas silvestres 41 y 1021 , y de 4 veces con respecto a las no inoculadas (control sin nitrógeno). Sin embargo, cuando las plantas de alfalfa fueron inoculadas con las cepas CFNM102, 104 y 105 mostraron una disminución ($p \leq 0.01$) significativa (1.7–3 veces) en el peso seco del follaje (Fig. 14) y de la raíz (Fig. 15) con respecto a la cepa silvestre.

Por último, se determinó el contenido total de nitrógeno en el follaje de las plantas. Las inoculadas con las cepas CFNM101 y CFNM103, tienen ($p \leq 0.01$) un incremento significativo (2 a 5 veces) en el contenido de nitrógeno por planta, con respecto a las cepas silvestres y a las control sin inocular (Fig. 16). Las inoculadas con las cepas CFNM102, CFNM104 y CFNM105 mostraron una disminución (1.3-4 veces) con respecto a las plantas inoculadas con las cepas silvestres y con las plantas no inoculadas (Fig. 16).-

Los valores de crecimiento (peso seco de follaje y raíz) y contenido de nitrógeno de plantas de alfalfa inoculadas con cepas con un menor número de copias fue similar a los obtenidos en plantas control sin inocular (Figs. 14c, 15c y 16c).

Las figuras 17 y 18, muestran de manera representativa, plantas de alfalfa inoculadas con las distintas cepas. Las plantas inoculadas con CFNM101 (Fig. 17) y CFNM103 (Fig. 18) muestran efectivamente un incremento en el tamaño de su follaje y de la raíz con respecto a la silvestre en contraste, tanto con las inoculadas con las cepas CFNM102, CFNM104 (Fig. 17) CFNM105 (Fig. 18) como con las “plantas control” que mostraron una disminución con respecto a cada cepa silvestre.

CFNM102, CFNM104 (Fig. 17) CFNM105 (Fig. 18) como con las “plantas control” que mostraron una disminución con respecto a cada cepa silvestre.

Las figuras 19 y 20 muestran los fenotipos de las raíces de plantas de alfalfa inoculadas con las distintas cepas. Las plantas inoculadas con CFNM101 (Fig. 19) y CFNM103 (Fig. 19) muestran un incremento en el número de nódulos en comparación con la cepa silvestre y con las inoculadas con las cepas CFNM102, CFNM104 (Fig. 20) y CFNM105 (Fig. 20) que presentan un menor número de nódulos.

II.1. Estabilidad de la amplificación durante la simbiosis.

El análisis de hibridación y cuantificación densitométrico de las colonias de bacterias obtenidas de los nódulos de alfalfa cosechados para determinar la estabilidad de la región simbiótica amplificada, mostró que estas cepas (Fig. 21, líneas B, D, F, H y J) tienen el mismo número de copias que las cepas usadas como inoculantes (Fig.21, líneas A, C, E, G e I).

DISCUSION

La amplificación génica es un fenómeno que ha sido observado y descrito en procariotas, levaduras, *Drosophila* y vertebrados (Stark y Wahl.,1984). Para que el proceso de amplificación pueda ser llevado a cabo es necesaria la presencia previa de una duplicación, lo cual presupone una situación inestable altamente reactiva en términos de recombinación génica. La recombinación homóloga entre las secuencias duplicadas tiene como resultado la pérdida de la duplicación o bien la amplificación posterior del segmento de DNA (Anderson y Roth.,1997). Como ya se dijo, las regiones en cada extremo, repetidas y en orientación directa, participan en fenómenos recombinatorios que se pueden manifestar como la amplificación de tales secuencias del DNA. Estas estructuras pueden experimentar eventos recombinatorios posteriores incrementando el nivel de amplificación pero también pueden ser deletadas (Flores, et al., 1993; Palacios, et al., 1993).

La estrategia genética utilizada en este estudio constituye un enfoque directo para manipular el genoma y seleccionar amplificación génica de una región específica de DNA de *R. meliloti*. La construcción de un plásmido que tuviese un origen de duplicación ajeno a la maquinaria duplicativa de *Rhizobium* y que portara los genes de interés permitió seleccionar aquellas colonias que habían cointegrado, mediante un mecanismo de recombinación homóloga, este plásmido en el genoma. Se utilizó como fenotipo seleccionable la resistencia al antibiótico tetraciclina, gen marcador del plásmido.

Una vez confirmada la cointegración de este plásmido, se tuvo como meta amplificar las unidades duplicadas dentro del genoma de *R. meliloti* 41 y 1021. Si existen las condiciones adecuadas de selección, las cepas que porten amplificaciones sucesivas pueden aislarse de la población, incrementando la dosis de tetraciclina.

Esta estrategia se siguió porque el plásmido en el que se clonaron los genes de interés (pSUP202) es resistente a tetraciclina y porque *R. meliloti* es sensible. Sin

antibiótico) puede generar amplificaciones. El nivel de amplificación se incrementó en relación directa a la concentración del antibiótico, seleccionándose cepas con amplificaciones posteriores (Anderson y Roth.,1997; Albertini y Galizzi.,1985; Peterson y Rownd.,1985).

Sin embargo, en este trabajo no ocurrió así, ya que el incremento en la concentración de Tc no fue directamente proporcional al nivel de amplificación de los genes de interés. Las colonias de ambas cepas crecieron hasta Tc100, pero de todas las cepas analizadas derivadas de *R. meliloti* 41 sólo se presentaron dos distintos niveles de amplificación: 3 copias (CFNM101) y 6 copias (CFNM102) y de las derivadas de *R. meliloti* 1021 todas presentaron el mismo nivel de amplificación 2.5 copias (CFNM103).

El gen de resistencia a Tc usado participa en la alteración de la permeabilidad de la membrana a este compuesto químico (Kaji y Ryoji.,1979). Es posible que este mecanismo particular de resistencia a Tc, distinto al de otros antibióticos utilizados como Kanamicina (inactivación del antibiótico) y cloramfenicol (acetilación del antibiótico) puede influir en que la amplificación génica no sea proporcional a la dosis de antibiótico.

El hecho de que los principales genes que participan en la formación del nódulo y la fijación del nitrógeno se encuentren localizados en el megaplásmido pSym-a de *R. meliloti*, dá la posibilidad de incrementar la fijación simbiótica de nitrógeno por amplificación de una región específica. Las cepas que se eligieron portan una región en la que se encuentran tres elementos claves que participan en la simbiosis y en la fijación de nitrógeno: El gen *nodD1*, cuyo producto es un activador transcripcional de los otros genes *nod* (Göttfert, et al, 1986; Honma y Ausubel.,1987). Los genes *nodABC* que participan en la síntesis del esqueleto de carbono del factor de nodulación. NodC cataliza la polimerización de UDP-glucosamina (Geremia, et al.,1994), NodB es una N-acetilasa (John, et al.,1993) y NodA es una N-aciltransferasa (Röhrig, et al.,1994). El gen *nifN* que está involucrado en la síntesis del cofactor hierro-molibdeno de la

nitrogenasa. Mutantes en los genes *nodABC* no forman nódulos (Long, et al.,1982) y en el gen *nifN* no fijan nitrógeno (Aguilar, et al.,1987). Esta región tiene, además, otros componentes que son los genes de nodulación *nolI* y *nodN*. El inicio y la regulación de la transcripción de estos genes está localizada 4 Kb “upstream” del fragmento elegido (Fig. 4) por lo que se supone que en el estado amplificado sólo se transcribe una copia de estos genes, pero existe la posibilidad de expresión a partir del promotor del vector.

El uso de este enfoque de amplificación específica de DNA permitió obtener cepas de *R. meliloti* con ventajas simbióticas en la nodulación y fijación de nitrógeno que resultan en el incremento, en el crecimiento y el contenido de nitrógeno de las plantas de alfalfa hospederas. Los fenotipos simbióticos observados pudieran ser el resultado de varios factores. Sin embargo, en este trabajo no se determinó el mecanismo molecular de los fenotipos simbióticos observados. El incremento en el número de copias del gen regulatorio *nodD1* y/o de los genes estructurales *nodABC*, puede resultar en un aumento en la nodulación. Este incremento en la nodulación puede estar en relación con un ligero aumento en la producción de los factores de nodulación observado en las cepas CFNM101 y CFNM103 en relación a las cepas silvestres respectivas (datos no mostrados). Las cepas CFNM102, CFNM104 y CFNM105 con un mayor número de copias, mostraron un incremento en la producción de los factores de nodulación (datos no mostrados) pero presentaron una disminución en la nodulación (Figs. 11 y 12). En trabajos anteriores se observó que cepas portando plásmidos multicopia con genes *nod* disminuyeron la nodulación (Knight. et al.,1986). Un incremento en la nodulación puede conducir a un aumento en la fijación de nitrógeno. Adicionalmente, un incremento en la dosis génica del operon *nifN* puede tener un efecto directo en la fijación de nitrógeno.

Hay ejemplos que muestran que la manipulación de los genes *nod* en rhizobia afecta sus capacidades simbióticas. Una cepa de *R. leguminosarum* portando copias extras de los genes de nodulación (*nodABC*) en un plásmido multicopia mostró una

disminución en la capacidad de nodular plantas de *Vicia* (Knight, et al.,1986). La expresión constitutiva en diferentes rhizobia de un gen quimérico *nodD1*, conformado por la parte 5' del gen *nodD1* de *R. meliloti* y la parte 3' del gen *nodD* de *R. trifoli*, afecta la nodulación y la fijación de nitrógeno cuando es introducido en diferentes rhizobia (Spaink. et al.,1989). Su expresión en *R. trifoli* y *R. meliloti* resultó en una extensión del rango hospedero para nodular leguminosas tropicales: *Macroptilium atropurpureum*, *Lablab purpureus* y *Leucaena leucocephalum* (Spaink. et al.,1989). En *R. trifoli* y *R. leguminosarum* resultó en un incremento significativo en la fijación de nitrógeno durante la simbiosis con *Vicia sativa* y *Trifolium repens* (Spaink. et al.,1989). Cuando la amplificación génica es usada para incrementar funciones simples tales como la producción de ciertos compuestos específicos, el aumento en el número de copias es activado por la introducción de plásmidos multicopia. Esta estrategia tiene la desventaja de que el número de copias depende de las características de replicación del vector usado y no es posible manipularlo. Cuando una función finamente regulada está involucrada, el número de copias puede ser crítico. En este caso resulta más conveniente la amplificación por recombinación con la región homóloga de DNA. Esta situación es ejemplificada en este estudio. Cuando la región simbiótica de DNA (Fig. 4) fue introducida en un plásmido multicopia el número de copias fue de 7, resultando en una disminución en la nodulación (Fig. 12) y fijación de nitrógeno (Fig. 13).- En contraste, al inducir la amplificación de DNA a través de recombinación homóloga se obtuvieron cepas con diferente número de copias (Fig. 10).- Como se muestra aquí, un moderado incremento en el número de copias (2.5-3) produce un aumento en la nodulación (Fig. 12), fijación de nitrógeno (Fig. 13) y en el desarrollo de la planta (Figs. 14 y 15); un mayor número de copias de la región simbiótica (6 copias) resultó en un decremento de estas funciones.-

Se han hecho esfuerzos para mejorar la capacidad simbiótica de *R. meliloti* en alfalfa. Cepas modificadas genéticamente con copias extras de los genes *dct* (transporte de ácidos dicarboxílicos) y el gen *nifA*, mostraron un moderado incremento en la

simbiótica (6 copias) resultó en un decremento de estas funciones.-

Se han hecho esfuerzos para mejorar la capacidad simbiótica de *R. meliloti* en alfalfa. Cepas modificadas genéticamente con copias extras de los genes *dct* (transporte de ácidos dicarboxílicos) y el gen *nifA*, mostraron un moderado incremento en la capacidad de fijar nitrógeno en condiciones de campo (Bosworth, et al., 1994).- En este caso, plantas de alfalfa inoculadas con estas cepas modificadas presentaron un incremento limitado en su producción en comparación con plantas inoculadas con las cepas silvestres, pero los efectos pudieron también haber sido atribuidos a los sitios de inserción de los genes *dct* y *nif* (Scupham, et al., 1996).- En este trabajo se describen cepas de *R. meliloti* CFNM101 y CFNM103 con 2.5-3 copias de la región simbiótica elegida y muestran un incremento en la nodulación (Fig. 12), fijación de nitrógeno (Fig. 13) y desarrollo (Figs. 14 y 15) de plantas de alfalfa bajo condiciones ambientales controladas.- Sería interesante determinar si la amplificación específica de DNA puede ser usada en la agricultura.- A este respecto, es importante considerar dos requerimientos para desarrollar cepas mejoradas de *Rhizobium* para su uso como inoculantes efectivos: una alta capacidad simbiótica de fijación de nitrógeno y de competitividad. Por lo tanto, la amplificación específica de DNA puede ser una buena estrategia usada en cepas de *R. meliloti* nativas para obtener cepas modificadas, las cuales pueden ser más competitivas y persistentes en ciertas áreas donde la alfalfa es cultivada.

CONCLUSIONES

1.- Se construyó el plásmido pCH1, que porta un fragmento de 8.5 Kb que incluye el gen *nifN*, un ORF (ORF110) y los genes *nod D1* y *nod ABC* de *R. meliloti* 41. Este plásmido se cointegró vía una recombinación homóloga en la región de nodulación del pSym-a de *R. meliloti* 41 y 1021. La estructura resultante es una repetida directa de la región de 8.5 Kb, capaz de recombinar y generar cepas con igual o distinto nivel de amplificación que fueron seleccionadas incrementando la concentración de tetraciclina (marcador del plásmido).

2.-Se analizaron dos cepas derivadas de *R. meliloti* 41 que presentaron diferentes niveles de amplificación de la región elegida: CFNM101 con 3 copias y CFNM102 con 6, y una derivada de *R. meliloti* 1021 CFNM103 con 2.5 copias. Adicionalmente se obtuvieron por conjugación dos colonias, una de cada cepa, CFNM104 y CFNM105 con 7 copias. Estas colonias tienen el plásmido pKSK5 con el mismo fragmento de 8.5 Kb, sólo que en este caso está clonado en un plásmido multicopia.

3.- Las plantas de alfalfa inoculadas con las cepas CFNM101 y CFNM103 con un bajo número de copias muestran un incremento en la nodulación, fijación de nitrógeno y crecimiento, contrario a las plantas que fueron inoculadas con las cepas CFNM102, 104 y 105 con un mayor número de copias.-

4.- Se logró en este trabajo un mejoramiento significativo de la simbiosis en comparación con lo observado en anteriores estudios. Falta probarlo en campo.-

5.- La estrategia experimental utilizada en este estudio constituye una herramienta poderosa que permite manipular el genoma y sobreexpresar genes específicos de nodulación y/o fijación de nitrógeno a fin de evaluar su efecto en la simbiosis

Rhizobium -planta.

FIGURAS

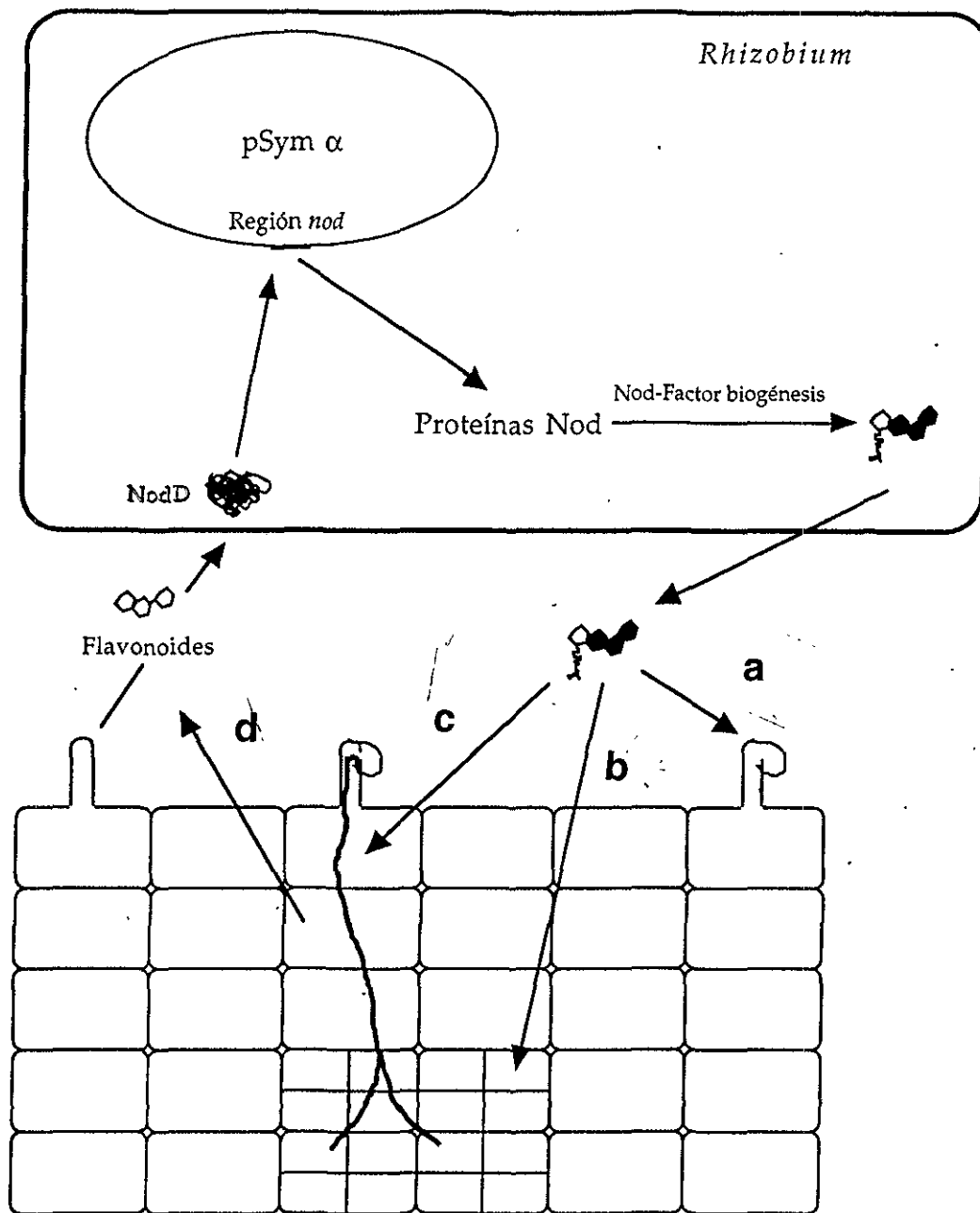


Figura 1. Representación esquemática de la interacción entre *Rhizobium*-planta. La planta libera compuestos flavonoides desde la raíz, los cuales funcionan como inductores vía la asociación con proteínas NodD, regulando la transcripción de los genes *nod*. Los productos de los genes *nod* participan en la biosíntesis y secreción de los factores Nod. Estos factores son capaces de iniciar la formación del nódulo provocando en el hospedero varios tipos de respuestas: (a) deformación de pelos radiculares; (b) división de células corticales; (c) pueden participar en ciertas etapas de la formación del tubo infectivo e incluso (d) pueden incrementar la producción de compuestos flavonoides. Modificado de van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. 1995.

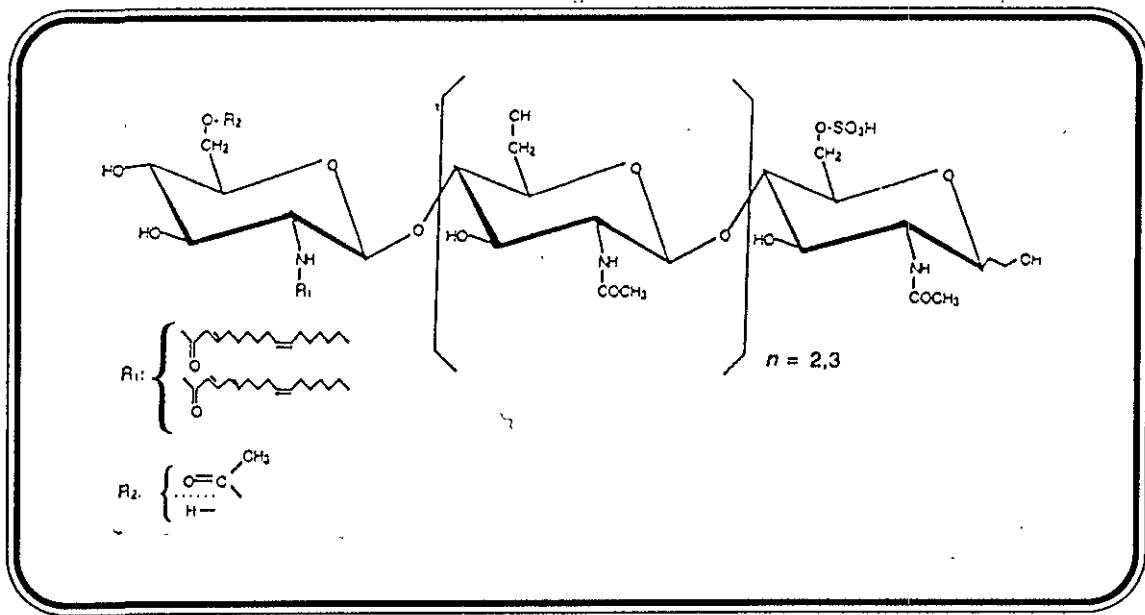


Figura 2.

Estructura de los principales factores de Nodulación aislados de *R. meliloti*. Tomado de Schultze, et al., 1994.

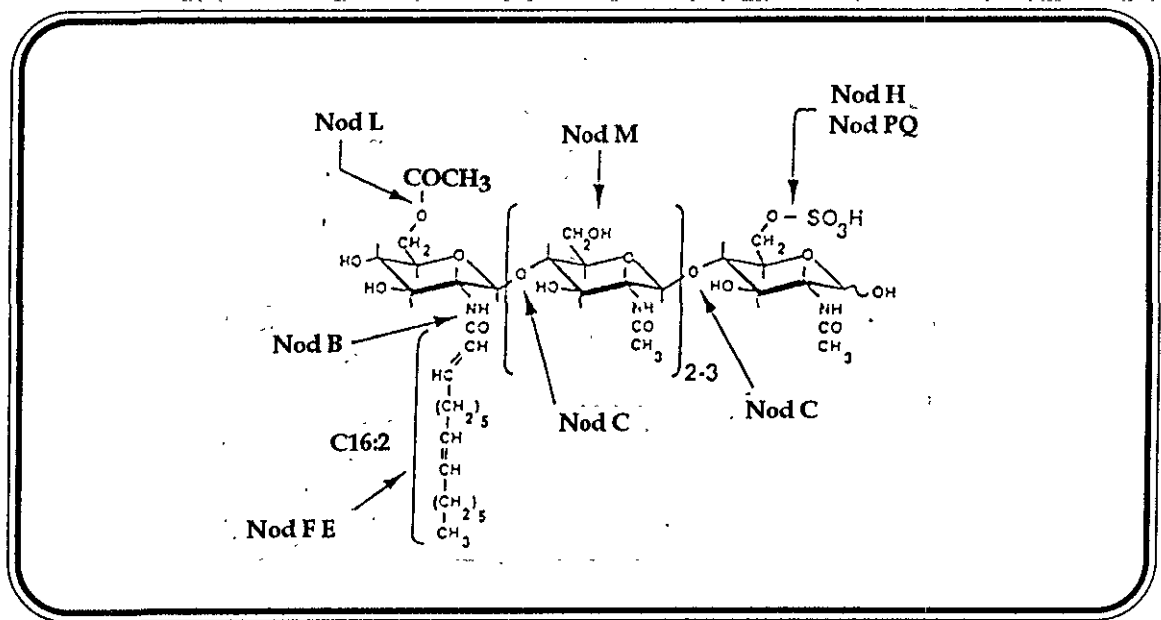


Figura 2 A. Papel de los genes *nod* en la biosíntesis de los factores Nod de *R. meliloti*. Las proteínas Nod muestran homología con (o actividad de) las siguientes enzimas: NodA participa en la acilación del factor Nod; NodB, quitina-oligosacárido deacetilasa; NodC, quitina-sintasa; NodE, β -cetoacilsintasa; NodF, proteína acarreadora de acilos; NodH, sulfotrasferasa; NodL, acetiltrasferasa; NodM, glucosamina sintasa; NodPQ, ATP sulfurilasa y APSquinasa. Tomado de Dénairé, J, y Cullimore, J. (1993).

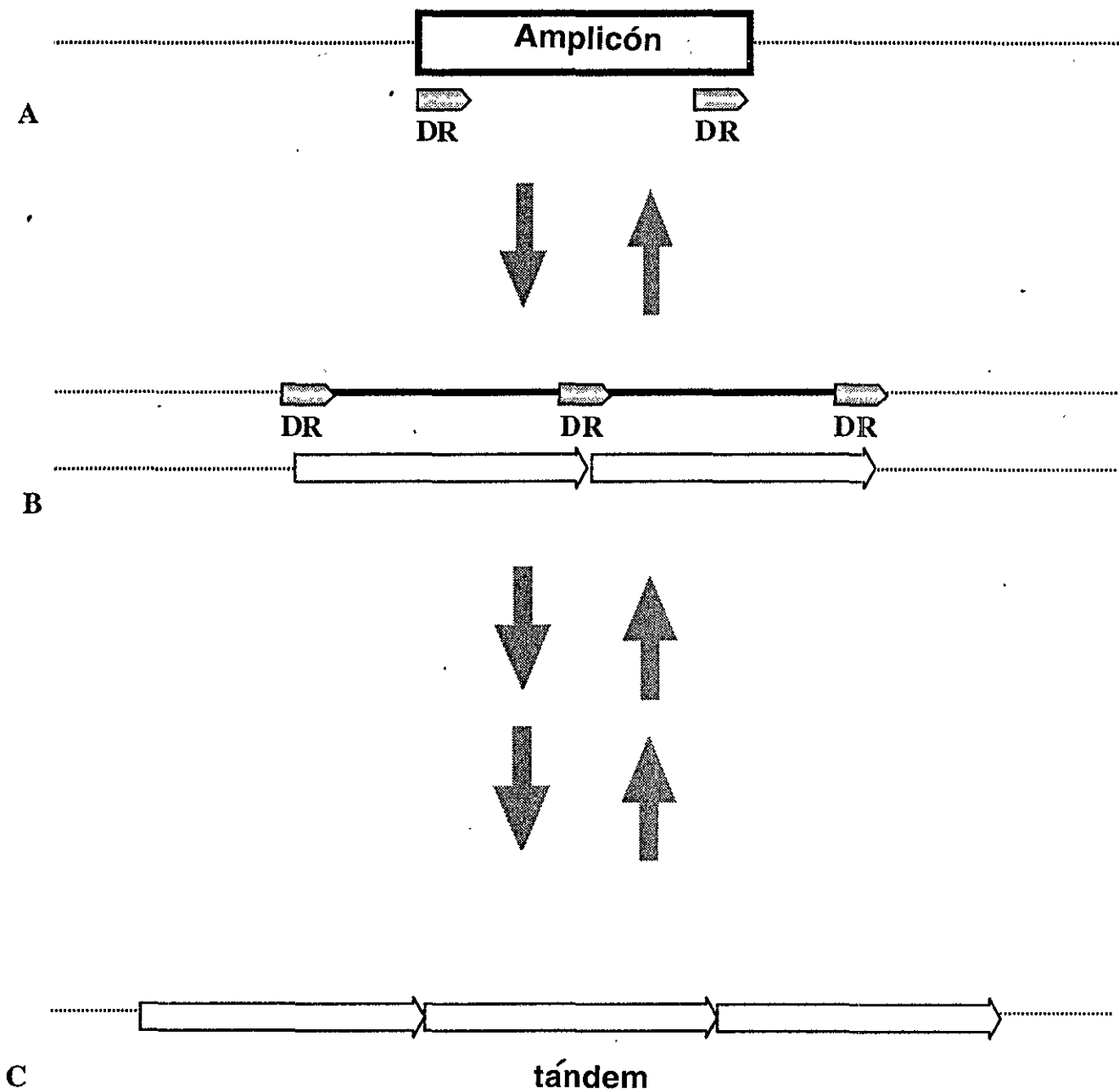


Figura 3. Modelo dinámico del genoma de *Rhizobium*. La unidad **Amplificón** (A) consiste de una región de DNA limitada por dos secuencias repetidas en orientación directa (DR). Estas secuencias pueden ser puntos para recombinación homóloga dependientes de RecA. Como resultado, se produce la primera duplicación (B). Amplificaciones en tándem (C) y deleciones del material genético. Estos fenómenos suceden a diferentes niveles y frecuencias.

TABLA I

CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Cepas Bacterianas/ Plásmidos	Características Relevantes	Referencias
<u><i>R. meliloti</i></u>		
Rm41	Tipo silvestre, <i>rec+nolR</i> , Sp ^R	Kondorosi, E. et. al. (1977)
Rm 1021	Tipo Silvestre.	Meade, R. et. al. (1982)
CFNM 101	Derivada de <i>R. meliloti</i> 41, Tc ^R Portadora del fragmento EcoRI En 3 copias	En este trabajo
CFNM 102	Derivada de <i>R. meliloti</i> 41, Tc ^R Portadora del fragmento EcoRI en 6 copias.	En este trabajo
CFNM 104	Derivada de <i>R. meliloti</i> 41, Tc ^R Con el Plásmido pKSK5.	En este trabajo
CFNM 103	Derivada de <i>R. meliloti</i> 1021, Tc ^R Portadora del fragmento EcoRI en 2.5 copias.	En este trabajo
CFNM 105	Derivada de <i>R. meliloti</i> 1021, Tc ^R Con el Plásmido pKSK5.-	En este trabajo
<u><i>E. coli</i></u>		
DH5	<i>recA1</i> , NaI ^R	Ausubel, F.M. et. al. (1994)
HB101	<i>recA</i> , Sm ^R	Ausubel, F.M. et..al. (1994)
<u>Plásmidos</u>		
pSup 202	Derivado de pBR325, <i>cos</i> , <i>mob. ori</i> (<i>colE1</i>) Cm ^R , Tc ^R , Amp ^R . 8.6 Kb	Simon, R. et.al. (1983)
pRK2013	Auxiliar para movilizar plásmidos; <i>tra</i> (RK2), <i>ori</i> (<i>colE1</i>) Km ^R	Ditta, G. et.al. (1980)
pKSK5	Derivado del pRK290 con un fragmento de 8.5 Kb EcoRI - EcoRI (<i>nol H</i> , <i>nol I</i> , <i>nod N</i> , <i>nif N</i> , <i>nod D1</i> , <i>nod</i> <i>ABC</i>) clonado en el sitio EcoRI. 28.5 Kb. Tc ^R	Kondorosi, E. et. al. (1984)
pCH1	Derivado del pRK 290 con un fragmento de 8.5 Kb EcoRI - EcoRI (<i>nol H</i> , <i>nol I</i> , <i>nod N</i> , <i>nif N</i> , <i>nod D1</i> , <i>nod</i> <i>ABC</i>) clonado en el sitio EcoRI del pSup 202. 16.7 Kb. Tc ^R , Ap ^R .	En este trabajo

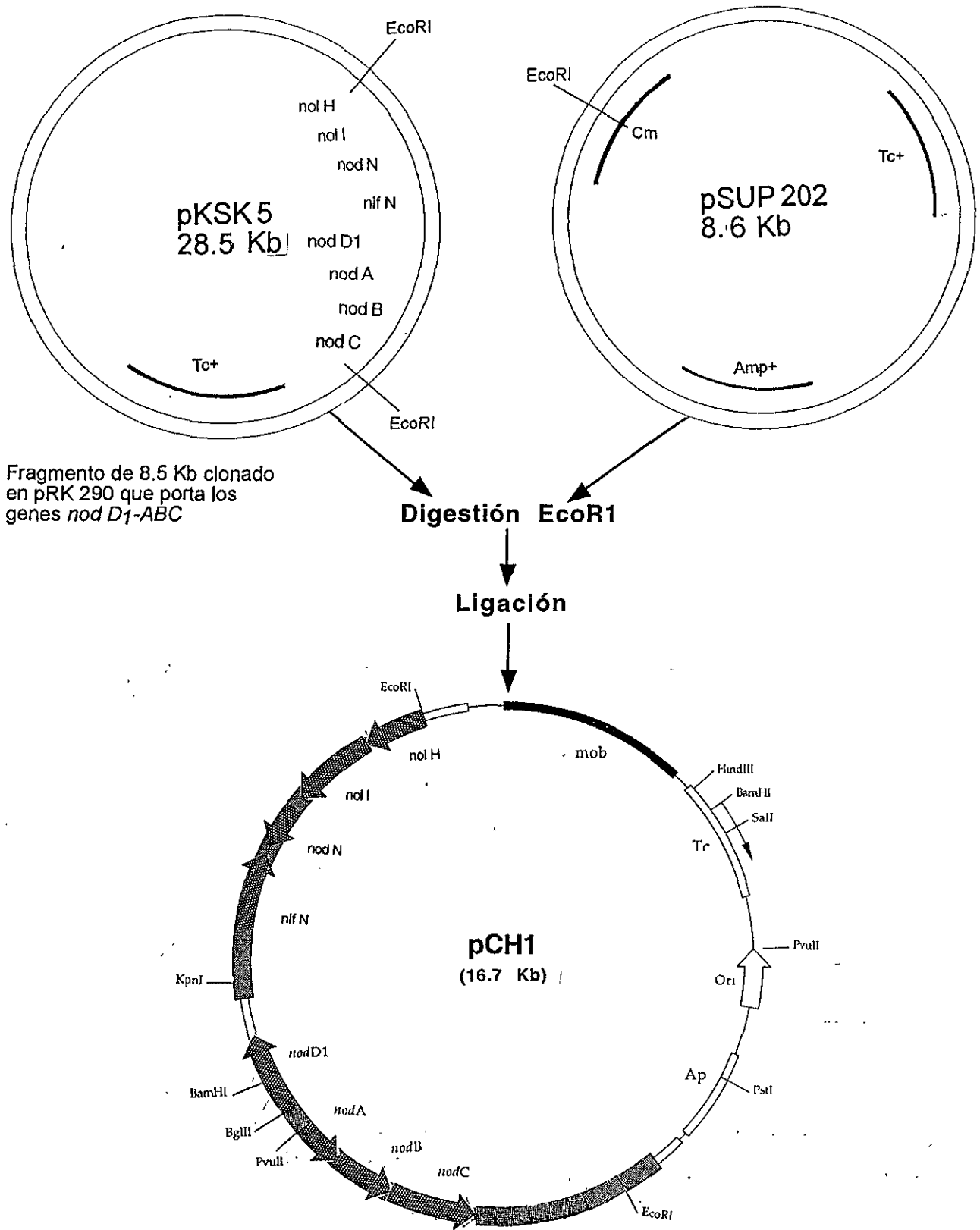


Figura 5. Construcción del plásmido pCH1. Este plásmido es derivado del pSUP202 y porta los genes *nol H*, *nol I*, *nod N*, *nif N*, *nod D1* y *nod ABC*.

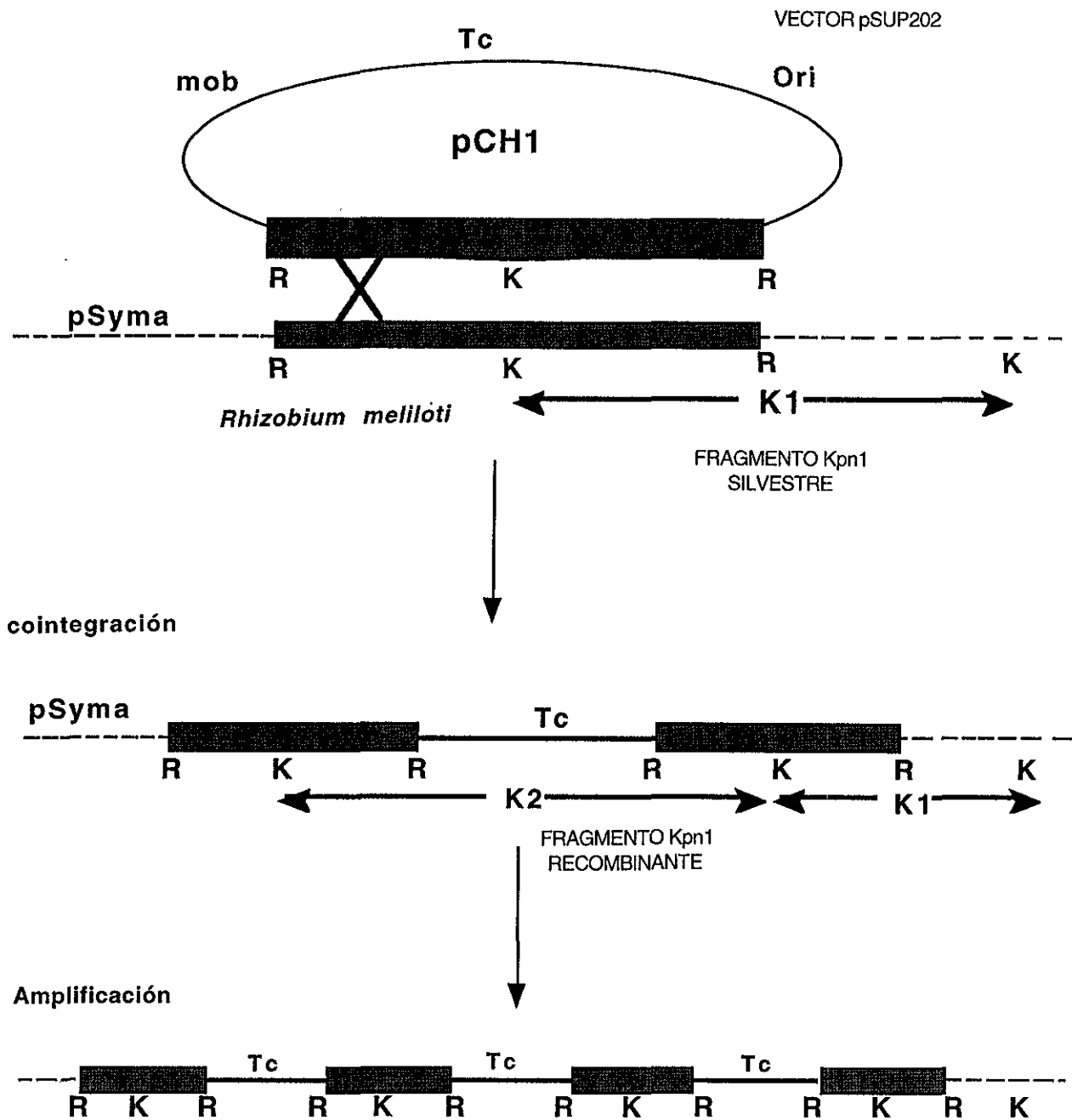
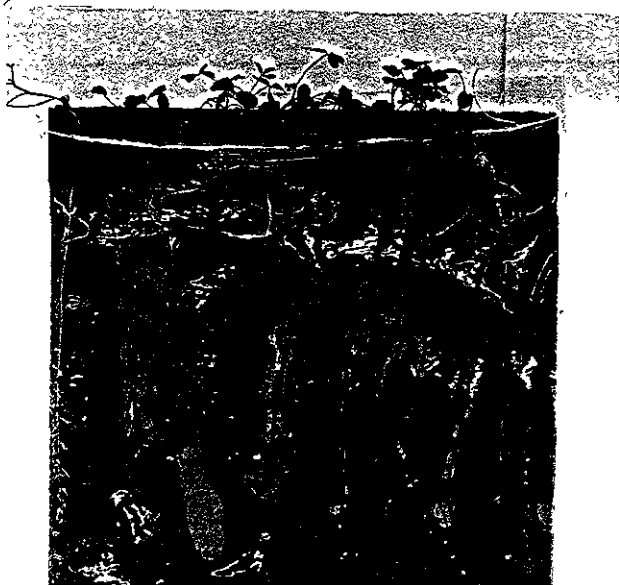


Figura 6. Construcción y caracterización de cepas de *R. melloti* con diferente número de copias del fragmento EcoRI.

A



B



Figura 7. Sistemas de crecimiento de plantas de alfalfa inoculadas con *R. meliloti*.

(A). Bolsas de papel (12.5cm x 15.5cm), medio líquido.

(B). Macetas con vermiculita.

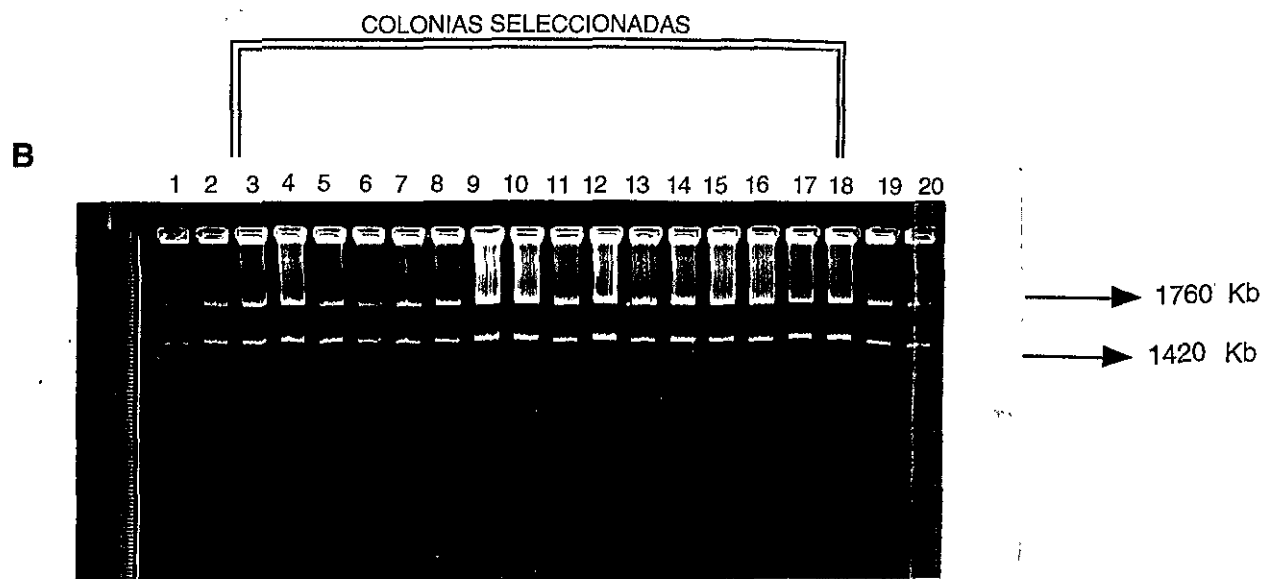
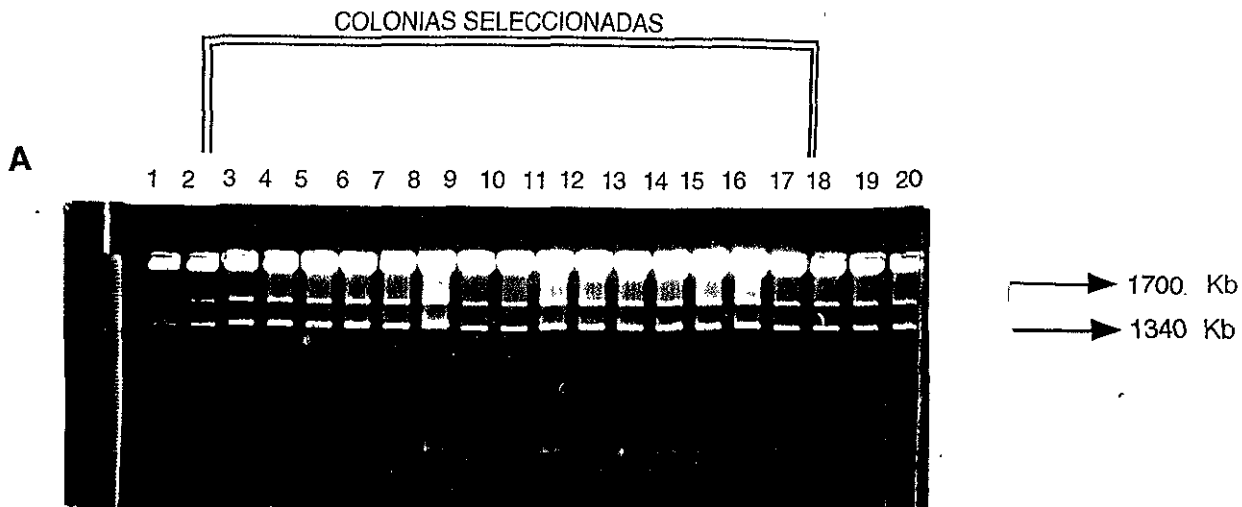


Figura 8. Perfiles plasmídicos de colonias derivadas de *R. meliloti* 41 (A) y 1021 (B). Los carriles 1 y 20 corresponden a la cepa silvestre y del carril 2 al 19 corresponden a las colonias seleccionadas Tc^R.

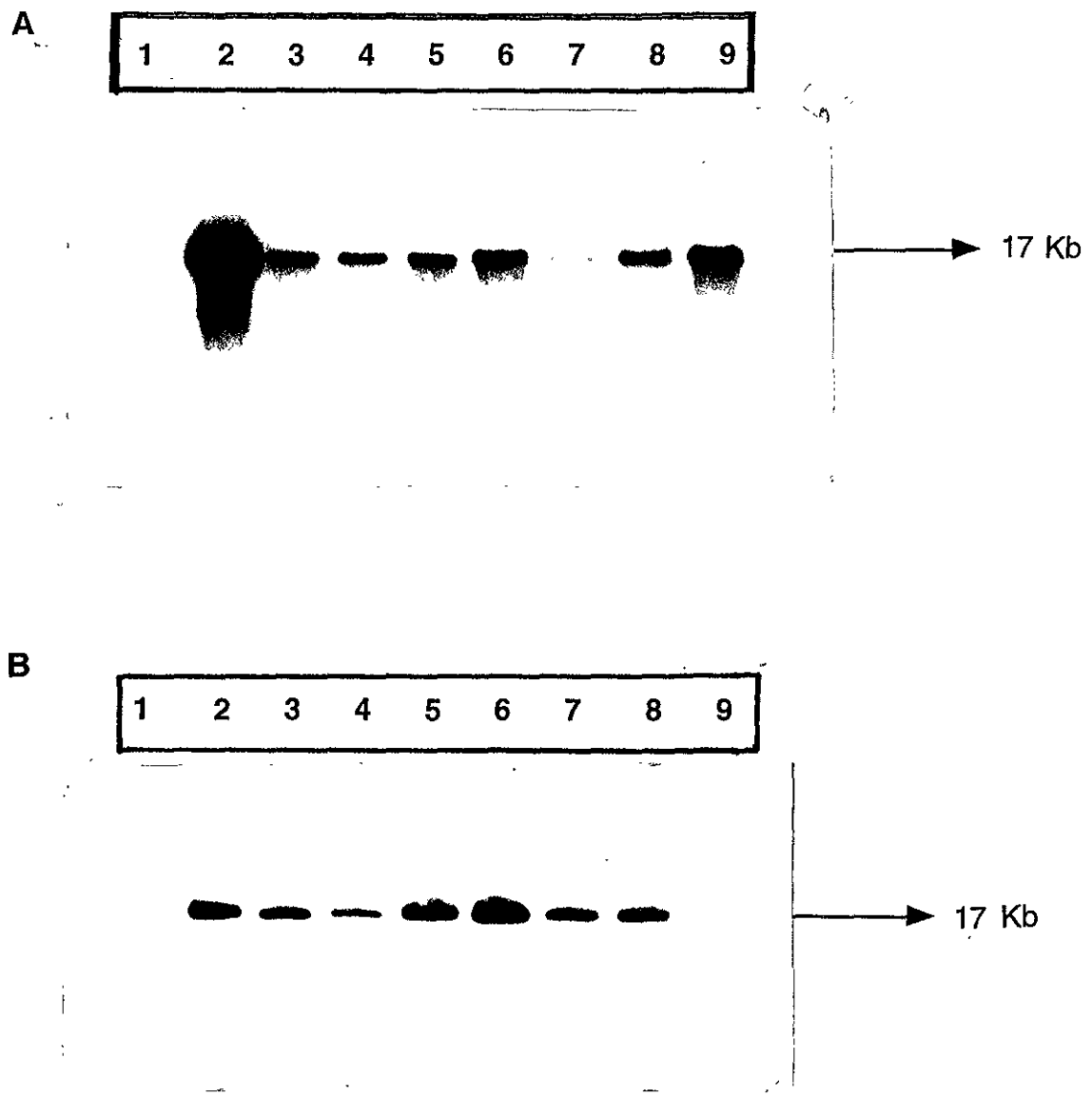


Figura 9. Hibridación de DNA total de *R. meliloti* 41 (A) y 1021 (B) digerido con la enzima de restricción Kpn1 utilizando como sonda radiactiva el plásmido pSUP 202.

(A). Carriles 3-9 cepas Tc^R derivadas de *R. meliloti* 41. Carril 1 cepa silvestre. Carril 2 vector pSUP 202.

(B). Carriles 2-8 cepas Tc^R derivadas de *R. meliloti* 1021. Carriles 1 y 9 cepa silvestre.

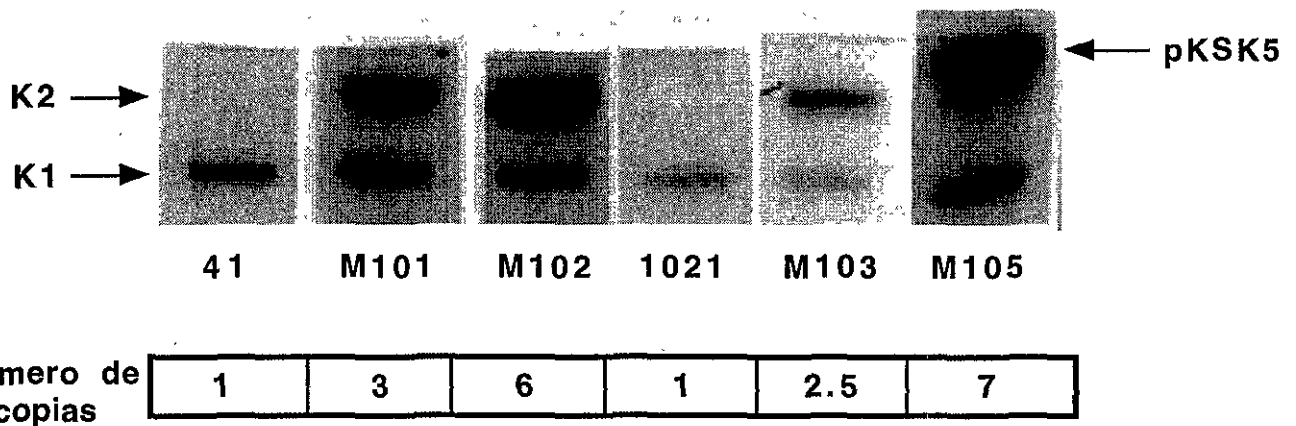
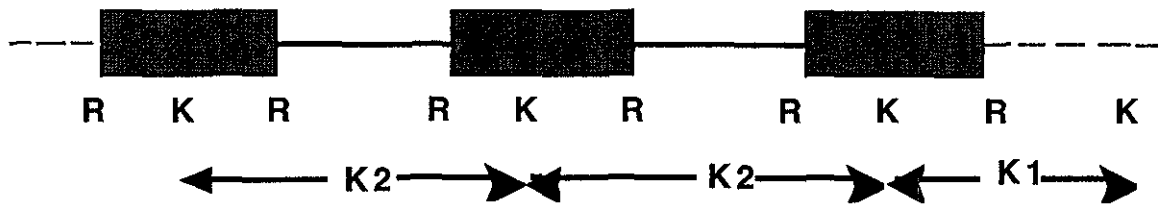


Figura 10. Hibridización de DNA total de las cepas elegidas con distinto número de copias del fragmento EcoR1 de *R. meliloti* 41 y 1021. Se utilizó como sonda radiactiva el producto de PCR *nod A*.

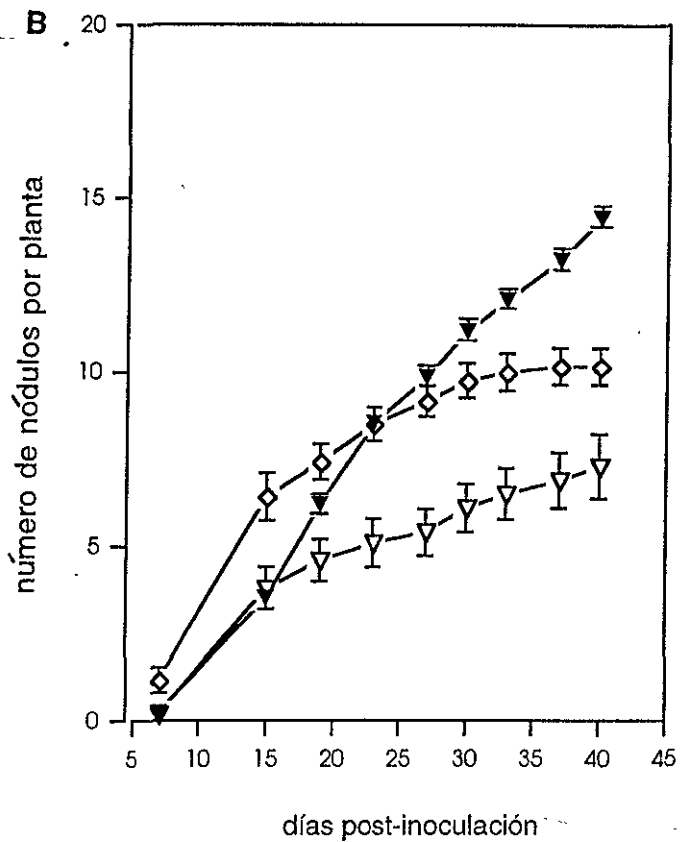
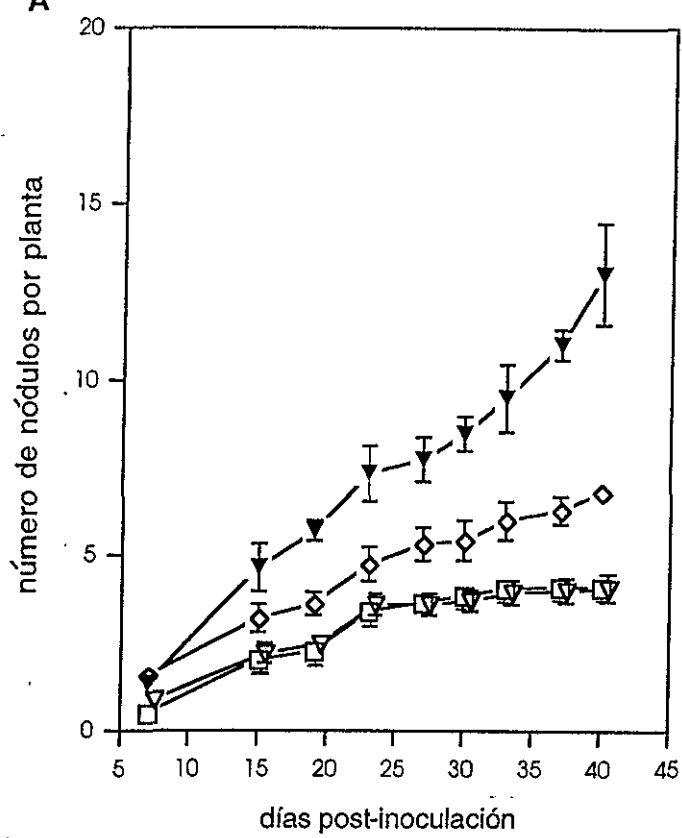


Figura 11. Cinética de nodulación de plantas inoculadas con las cepas portando diferentes tipos de amplificaciones. Los puntos representan el promedio y su correspondiente error estándar.

(A). Plantas inoculadas con: ◇ *R. meliloti* 41 ▼ CFNM101 □ CFNM102 ▽ CFNM104
 (B). Plantas inoculadas con: ◇ *R. meliloti* 1021 ▼ CFNM103 ▽ CFNM105

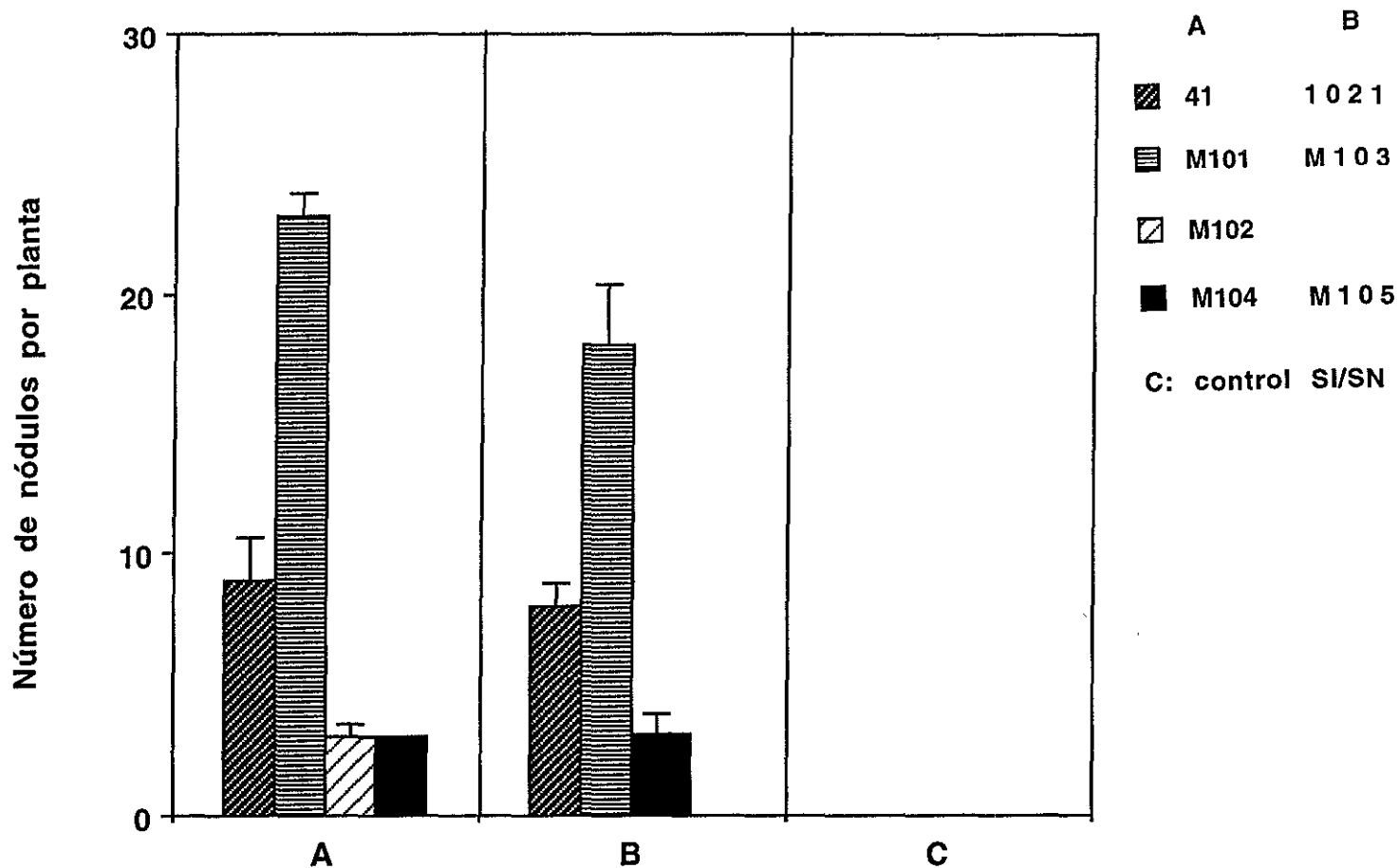


Figura 12. Capacidad de nodulación. Se determinó el número total de nódulos por planta ($x \pm SD$) a los 60 días post-inoculación, de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas arriba indicadas.

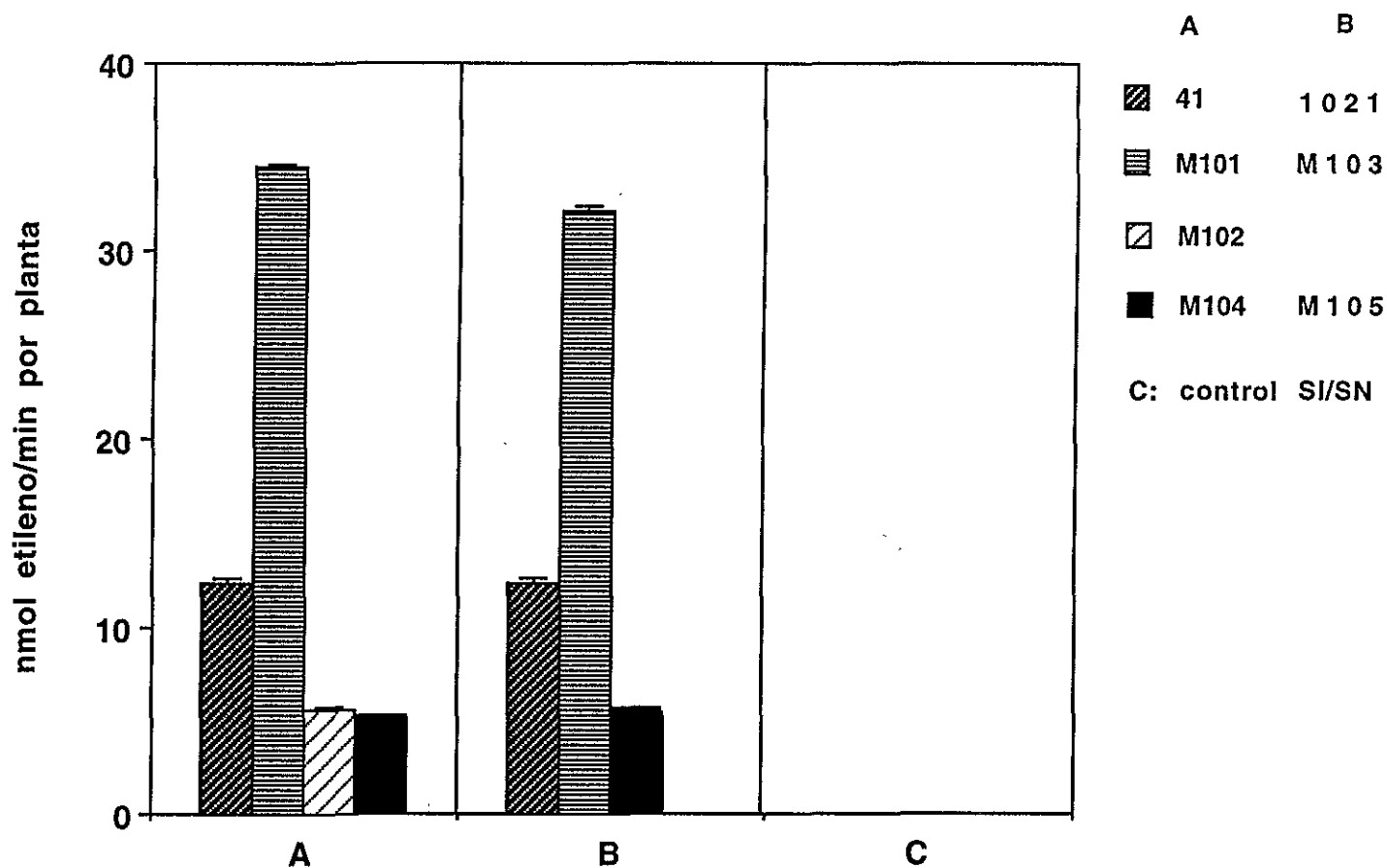


Figura 13. Actividad de la nitrogenasa. Se determinó la actividad total de la nitrogenasa (por reducción de acetileno) ($x \pm SD$) a los 60 días post-inoculación, en plantas de alfalfa inoculadas con las diferentes cepas arriba indicadas .

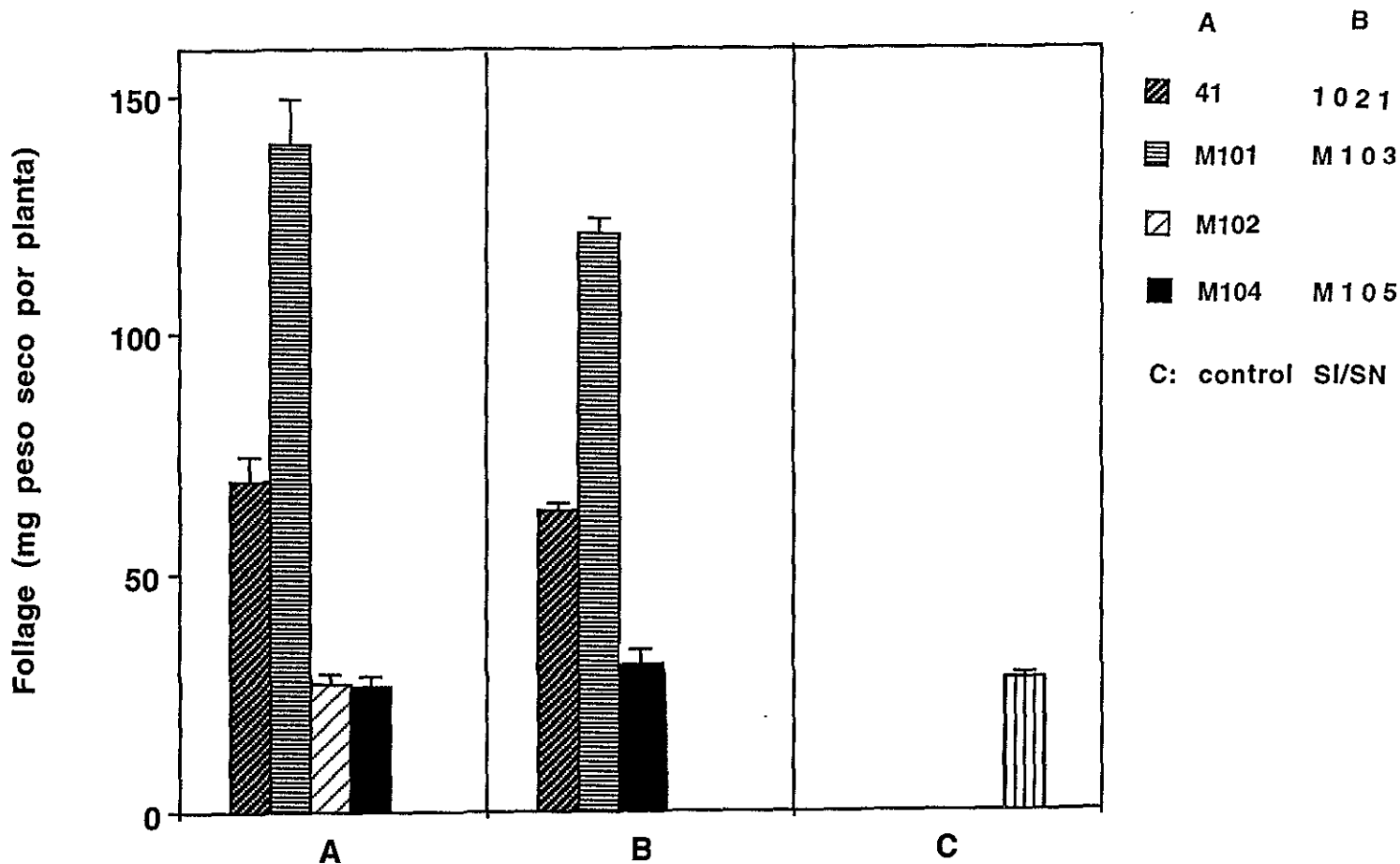


Figura 14. Crecimiento de follaje. Peso seco de follaje ($x \pm SD$) a los 60 días post-inoculación, de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas arriba indicadas.

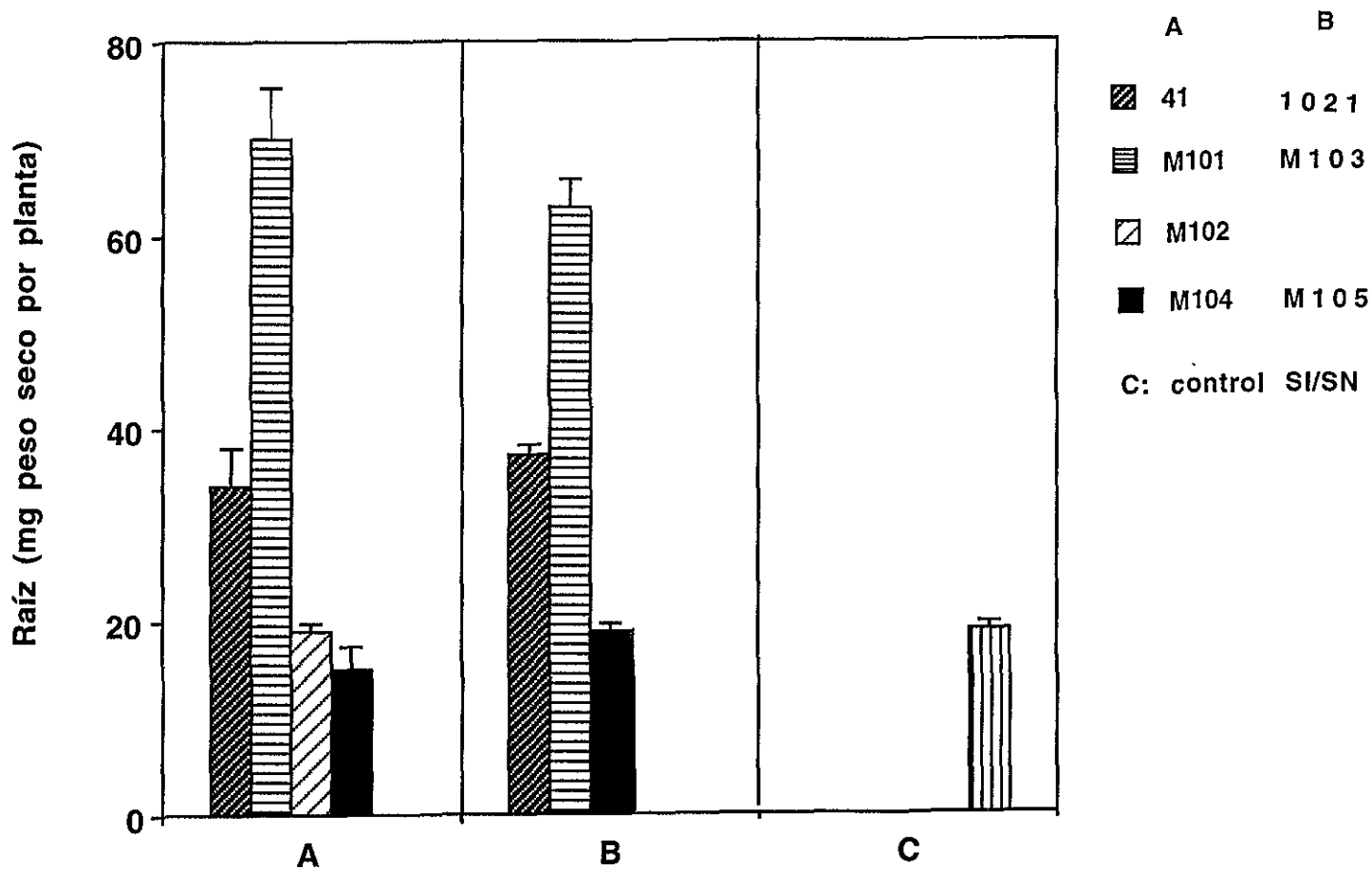


Figura 15. Crecimiento de raíz. Peso seco de raíz ($\bar{x} \pm SD$) a los 60 días post-inoculación, de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas arriba indicadas.

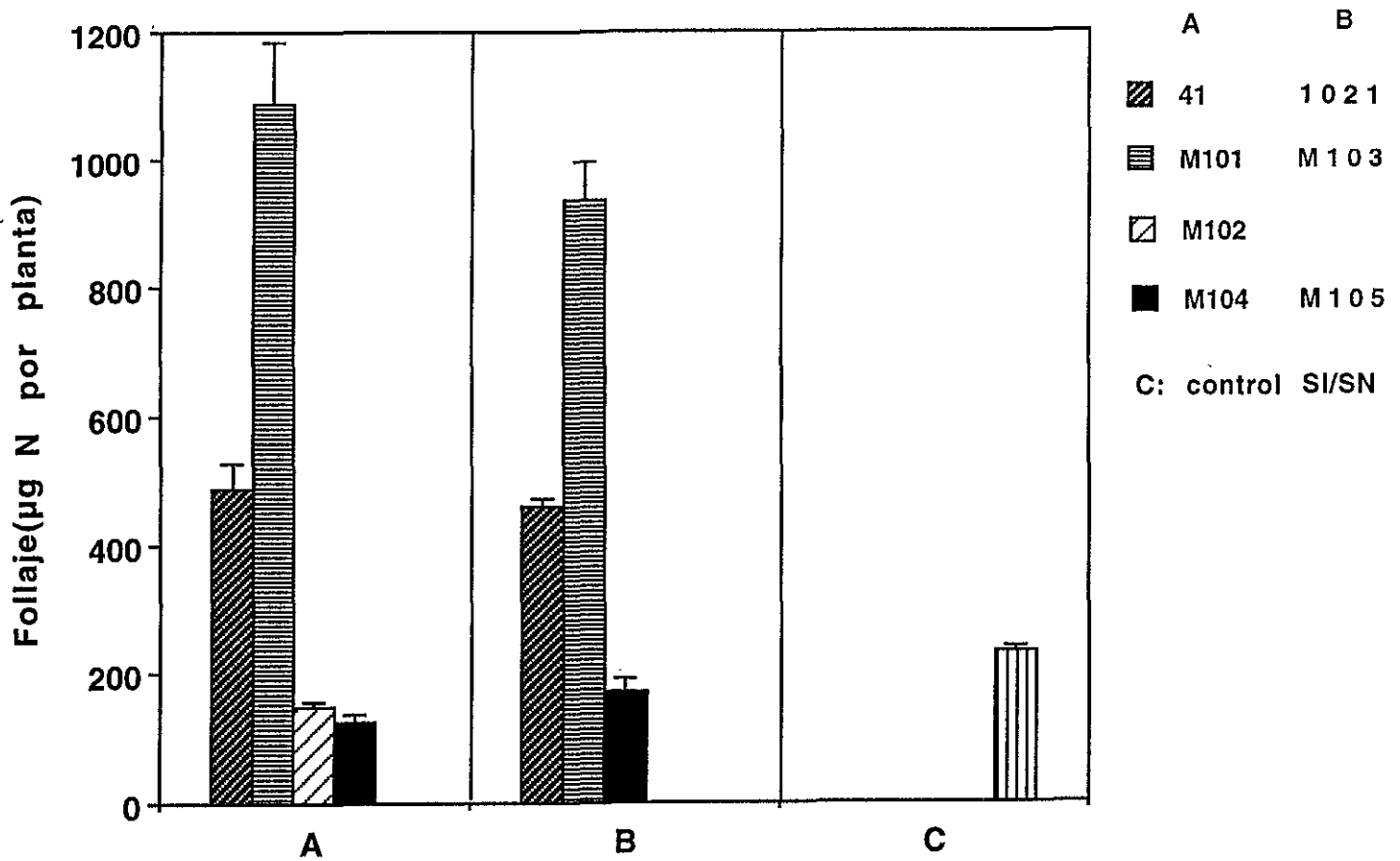


Figura 16. Contenido de nitrógeno del follaje. Contenido de nitrógeno ($x \pm SD$) a los 60 días post-inoculación, de plantas inoculadas con las cepas arriba indicadas.

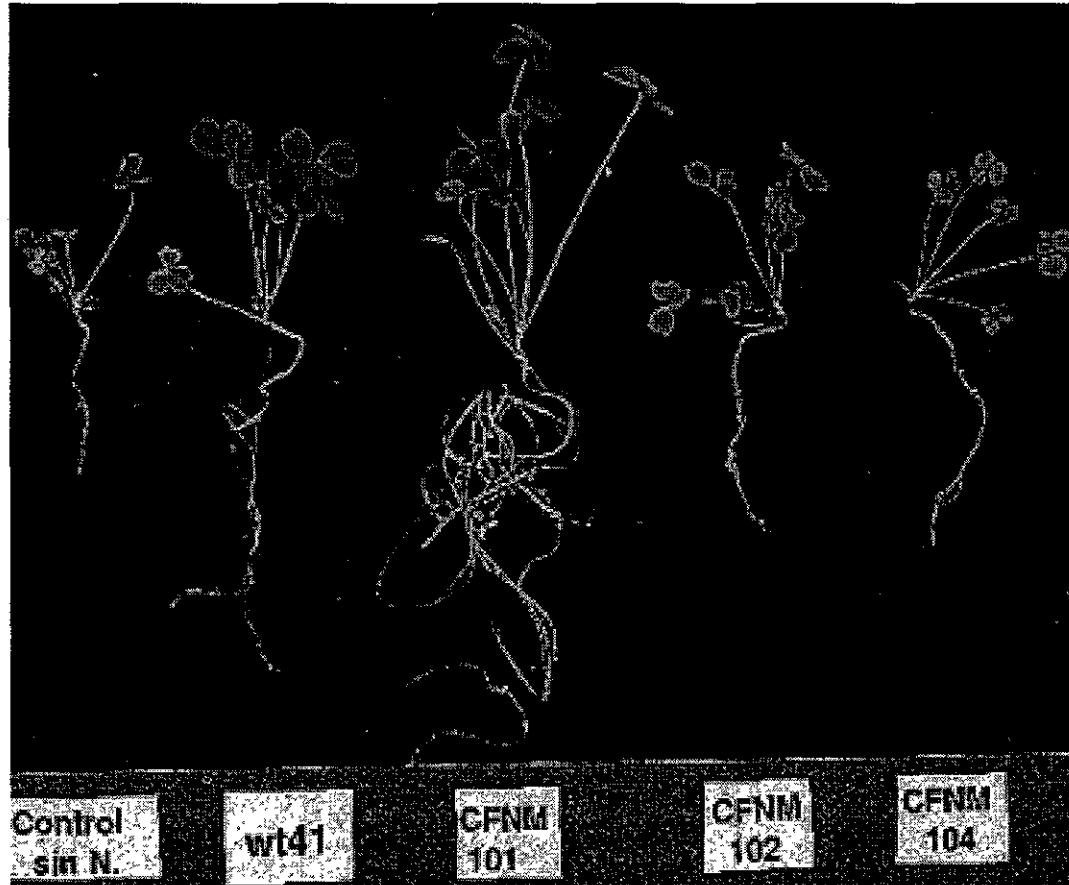


Figura 17. Planta de alfalfa inoculadas con las cepas derivadas de *R. meliloti* 41 con distinto número de copias del fragmento *Eco* R1.

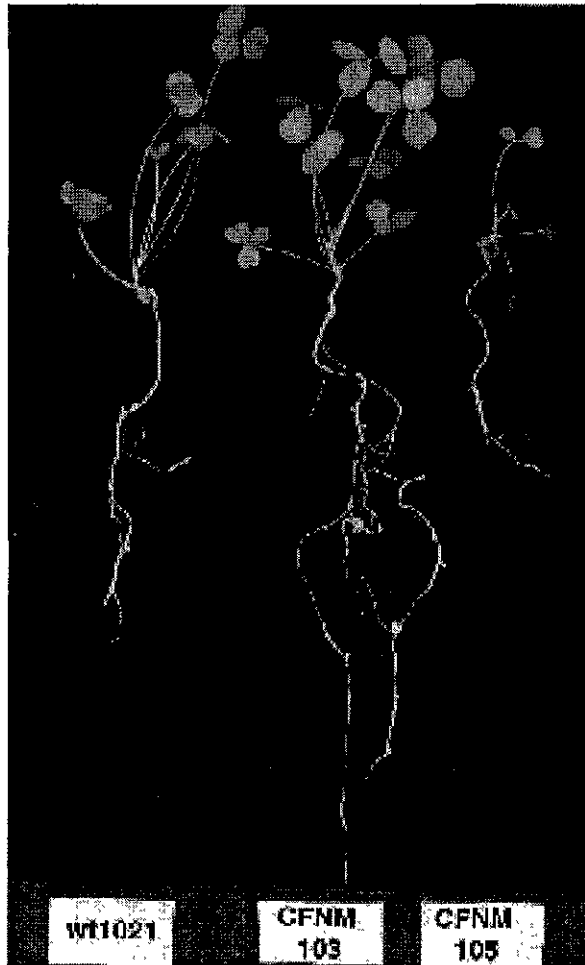


Figura 18. Plantas de alfalfa inoculadas con las cepas derivadas de *R. meliloti* 1021 con distinto número de copias del fragmento *Eco* R1

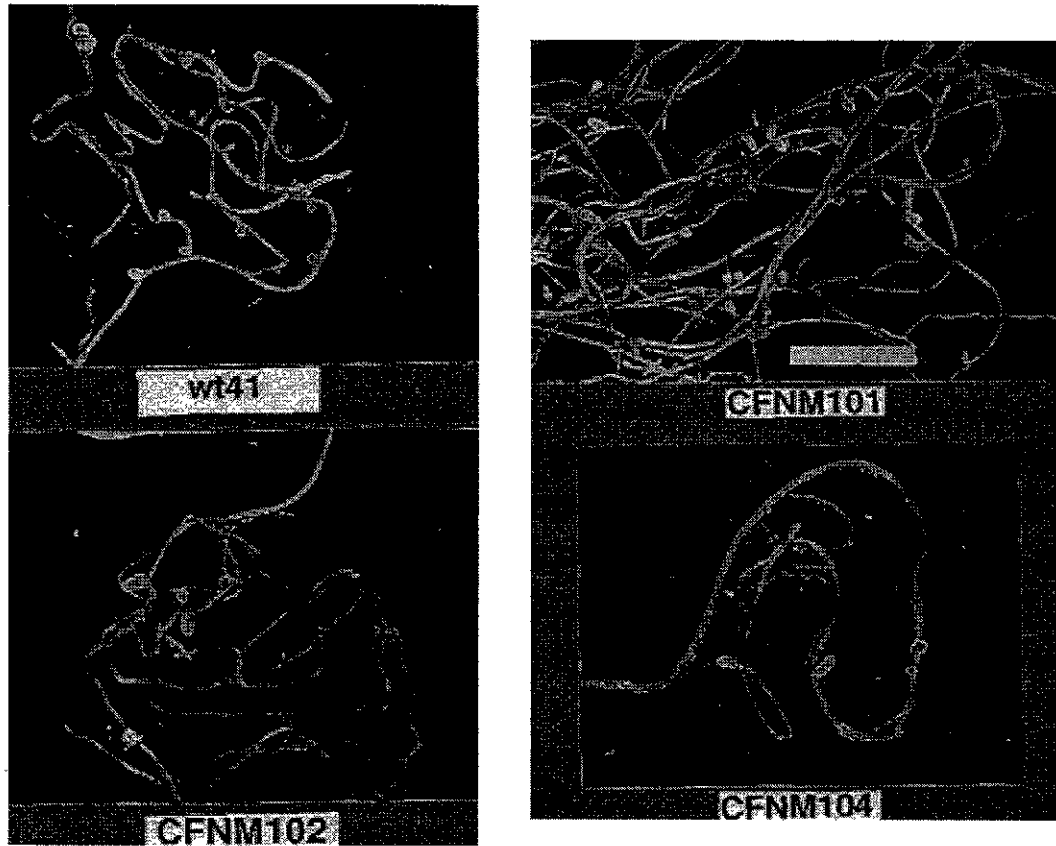


Figura 19. Raíces de plantas inoculadas con las cepas derivadas de *R. meliloti* 41 con distinto número de copias del fragmento *Eco* R1

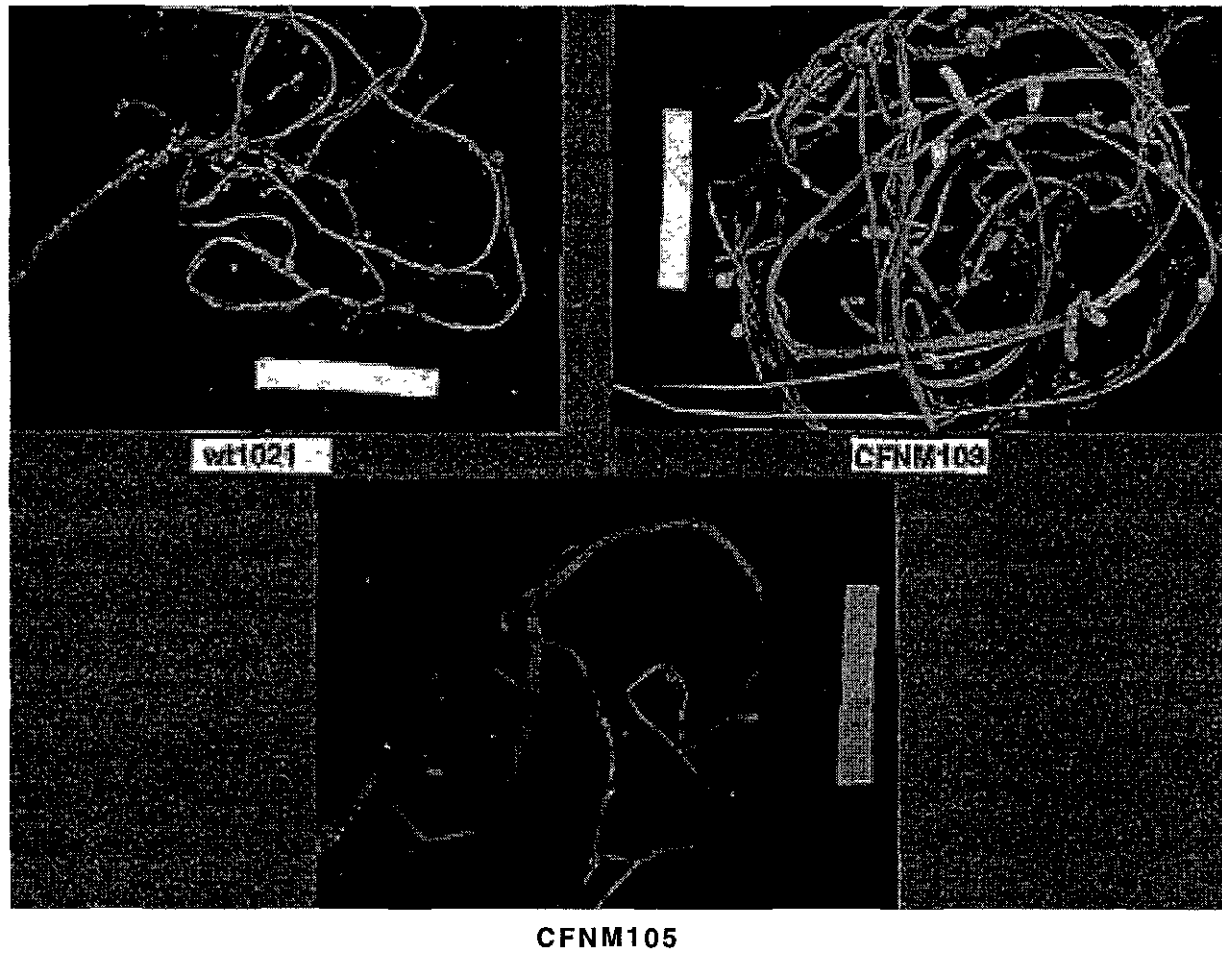


Figura 20. Raíces de plantas inoculadas con las cepas derivadas de *R. meliloti* 1021 con distinto número de copias del fragmento *Eco* R1.

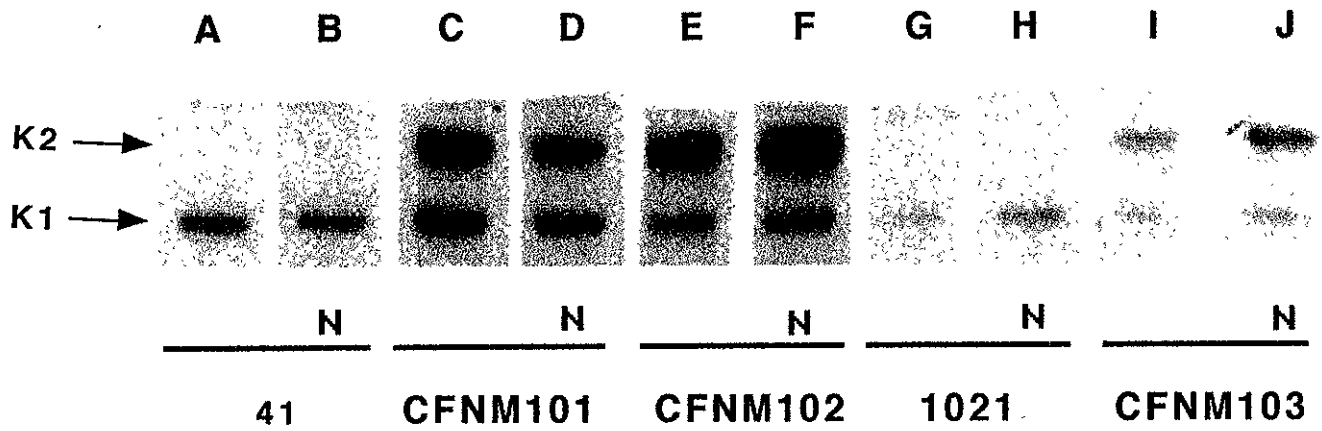


Figura 21. Hibridización de DNA total de las cepas elegidas con distinto número de copias del fragmento EcoR1: A y B, *R. meliloti* 41; C y D, CFNM101; E y F, CFNM102; G y H, *R. meliloti* 1021; I y J, CFNM103.

A, C, E, G e I; DNA extraído de cultivos bacteriales *in vitro*.

B, D, F, H y J; DNA extraído de bacterias obtenidas de los nodulos.

Se utilizó como sonda radiactiva el producto de PCR *nod A*.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, O.M., Kapp, D., and Puhler, A. 1985. Characterization of *Rhizobium meliloti* fixation gene (*fixF*) located near the common nodulation region. J. Bacteriology. 164:245-254.
- Aguilar, O.M., Reiländer, H., Arnold, W., and Pühler, A. 1987. *Rhizobium meliloti nifN (fixF)* gene is part of an operon regulated by a *nif A* -dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to the *nifK* gene product. J. Bacteriol. 169:5393-5400.
- Aguilar, M.O., Taormino, J., Thony, B., Ramseier, T., Hennecke, H. and Szalay, A.A. 1990. The *nif* EN genes participating in FeMo cofactor biosynthesis and genes encoding dinitrogenase are part of the same operon in *Bradyrhizobium* species. Mol. Gen. Genet. 224:413-420.
- Albertini, A.M and Galizzi, A. 1985. Amplification of a chromosomal region in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 162:1203-1211.
- Anderson, R.P. and Roth, J.R. 1997. Tandem genetic duplications in phage and bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 31:473-478.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D. Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1994. Current protocols in molecular biology. Vol.3. J.Wiley and Sons, Inc. USA.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., and Kondorosi, A. 1991. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nod M* codes for D-glucosamine synthetase. Mol. Gen. Genet. 228: 113-124.
- Baev, N. and Kondorosi, A. 1992. Nucleotide sequence of the *Rhizobium meliloti nodL* gene located in locus n5 of the *nod* regulon. Plant Mol Biol. 18:843-846.
- Balleza, M.D. 1998. Análisis de secuencias de ADN y predicción de rearrreglos genómicos en *Rhizobium*. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH, UNAM.
- Barnett, M.J., Rushing, B.G., Fisher, R.F. and S.R. Long. 1995. Transcriptional start sites for *syrM* and *nodD3* flank an insertion sequence relic in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 178:1782-1787.
- Batut, J., M. L. Daveran-Mingot, M. David, J. Jacobs, A. M. Garnerone, and D. Kahn. 1989. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. EMBO J. 8:1279-1286.
- Better, M., B. Lewis, D. Corbin, G. Ditta and D.R. Helinski. 1983. Structural relationships among *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters. Cell. 35:479-487.
- Bosworth, A.H., Williams, M.K., Albrecht, K.A. Kwiatkowski, R., Beynon, J., Hankinson, T.R., Ronson, C.W., Cannon, F., Wacek, T.J and Triplett, E.W. 1994. Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dct* ABD and/or modified *nif A* expression. Appl. Environ. Microbiol. 60:3815-3832.
- Brewin, N.J., Downie, J.A. and Young, J.P.W. 1992. Nodule formation in legumes. In: Encyclopedia of Microbiology. 3:239-248.
- Cevallos, M. A., S. Encarnación, A. Leija, Y. Mora, and J. Mora. 1996.- Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate. J. Bacteriol. 178: 1646-1654.

Rhizobium meliloti regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by (ω -1)-hydroxylated fatty acids. EMBO J. 13:2139-2149.

Demont, N., Debelle, F., Aurelle, H., Dénarié, J., and Promé, J. 1993. Role of the *Rhizobium meliloti* *nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharidic nodulation factors. J. Biol. Chem. 268: 20134-20142.-

Dénarié, J., Debelle, F., and Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. Annu. Rev. Microbiol. 46:497-531.-

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D. R. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Genetics. 77:7347-7351.

Dowds, B. C. A., O'Kane, Gormley, E., McConnell, D. J. and Devine, K. M. 1988. Integrating plasmids in the genetic engineering of *Bacilli*. In: Recombinant DNA and bacterial fermentation. J. A. Thomson (ed) CRC Press. Florida, U. S. A. 137-156 pp.

Dusha, I., S. Kovalenko, Z. Banfalvi and A. Kondorosi. 1987. *Rhizobium meliloti* insertion element ISRm2 and its use for identification of the *fixX* gene. J. Bacteriol. 169:1403-1409.

Earl, C. D., Ronson, C. W. and Ausubel, F. M. 1987. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* *fixA*, *fixB*, *fixC* and *fixX* genes. J. Bacteriol. 169:1127-1136.

Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid. 1: 1403-1409.

Edlund T., Normark, S. 1981. Recombination between short DNA homologies causes tandem duplication. Nature. 292: 269-71.

Ehrhardt, D. W., Atkinson, E. M. and Long, S. R. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. Science. 256: 998-1000.

Elmerich, C. Houmard, J., Sibold, L. Manheimer, I., and Charpin, N. 1978. Genetic and biochemical analysis lo mutants induced by bacteriophage Mu DNA integration into *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes. Biochimie. 165:181-189.

Etcheverry, M. T. 1985. Amplification of the cooper-chelatin gene in yeast. In. Genome Rearrangement. M. Simon y I. Herskowitz (eds.) Alan R. Liss, Inc., N. Y. 336 pp.

Fisher, R. F. and Long, S. R. 1992. *Rhizobium* plant signal exchange. Nature 357: 655-660.

Fischer, H. M., M. Babst, T. Kaspar, G. Acuña, F. Arigoni, and H. Hennecke. 1993. One member of a groESL-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. EMBO J. 12:2901-2912.

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

Flores, M., Brom, S., Stepkowski, T., Girard, M., Dávila, G., Romero, D., and Palacios, R. 1993. Gene amplification in *Rhizobium* identification and in vivo cloning of discrete amplifiable DNA regions (amplicons) from *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 4932-4936.

Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A. and Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature. 387:394-401.

- Geelen,D., Goethals,K., VanMontagu,M, and M., Holsters. 1995. The *nodD* locus from *Azorhizobium caulinodans* is flanked by two repetitive elements. *Gene*. 164:107-111.
- Geremia,R.A., Mergaert,P., Geelen,D., Van Montagu,M., and Holsters,M. 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2669-2673.
- Göttfert,M., Horvath,B., Kondorosi,E., Putnoky,P., Rodriguez-Quilfone,F. and Kondorosi,A. 1986. At least two *nod D* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 191:411-420
- Györgypal, Z., Iyer, N. and Kondorosi, A. 1988. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 212: 85-92.
- Hahn,M., and H. Hennecke.1987. Mapping of a *Bradyrhizobium japonicum* DNA region carrying for symbiosis and an asymmetric accumulation of reiterated sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2247-2252.
- Hardy,F.W.R., Holsten,D.R., Jackson, K.E and Burns,R.C.1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant. Physiol.*43:1185-1207.
- Honma,M.A. and F.M. Ausubel. 1987. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nod D* symbiotic regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:8558-8562.
- Honma, M. A., Asomaning, M. and Ausubel, F. M. 1990. *Rhizobium meliloti nod D* genes mediate host-specific activation of *nod ABC*. *J. Bacteriol.* 172: 901-911.
- John,M., Röhrig,H., Schmidt,J., Wieneke,U., and Schell,J. 1993. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:625-629.
- Kaji,A. and Ryoji,M. 1979. Tetracycline. In: Antibiotics: Mechanism of action of antibacterial agents. F. E. Hahn (ed.). vol. I. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, N.Y.
- Kaluza,K.,M. Hahn, and H. Hennecke. 1985. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the *nif* region of the *Rhizobium japonicum* genome. *J. Bacteriol.* 162:535-542.
- Kijne, J. W. 1992. The *Rhizobium* Infection Process. In: G. Stacey, R. H. Burris y H. J. Evans (ed.). Biological Nitrogen Fixation. Chapman y Hall. New York.-
- Knight, C. D., L. Rossen, J. G. Robertson, B. Wells, and J. A. Downie. 1986. Nodulation inhibition by *Rhizobium leguminosarum* multicopy *nod ABC* genes and analysis of early stages of plant infection. *J. Bacteriol.* 166: 552-558.
- Kondorosi,A.,G.B. Kiss,T. Forrai,E. Vincze, and Z. Banfalvi. 1977. Circular linkage maps of *Rhizobium meliloti* chromosome. *Nature*. 268:525-527.
- Kondorosi,E., Banfalvi,Z. and Kondorosi, A. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *R. meliloti* identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193:445-452.
- Lerouge,P., Roche,P., Faucher,C., Maillet,F., Truchet,G., Promé,J.C. and Dénairé,J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 344:781-784.
- Long,S.R.,W.J. Buikema, and F.M. Ausubel. 1982. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by

direct complementation of Nod mutants. *Nature*. 298:485-488.

Long, S. 1989 . *Rhizobium*-Legume Nodulation: Life together in the underground. *Cell*. 56: 203-214.

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

MacNeil,T., MacNeil,D., Roberts,G.P., Supiano, M.A., and Brill.W.J. 1978. Fine- structure mapping and complementation analysis of *nif* (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 136:252-266.

Maillet, F., Debellé, F. and Dénairé, J. 1990. Role of the *nodD* and *syr M* genes in the activation of the regulatory gene *nod3* and of the common and host-specific *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 4: 1975-1984

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* CSH Laboratory. 545 pp.

Margolin,W. and S.R. Long. 1994. *Rhizobium meliloti* contains a novel second homolog of the cell division gene *ftsZ*. *J. Bacteriol.* 176:2033-2044.

Marie, C.,M.A. Barny, and J.A. Downie.1992. *Rhizobium leguminosarum* has two glucosamine synthases, Glms and NodM, required for nodulation and development of nitrogen-fixing nodules. *Mol. Microbiol.* 6:843-851

Martínez, E., D. Romero and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 9: 59-93.

Mavingui, P., Flores, D., Romero, D., Martínez-Romero, E., and Palacios, R.1997. Generation of *Rhizobium* strains with improved symbiotic properties by random DNA amplification (RDA). *Nature Biotechnol.* 15:564-569.

Mavingui,P., Laeremans,T., Flores,M., Romero,D., Martínez-Romero,E. and R. Palacios. 1998. Genes essential for Nod factor production and nodulation are located on a symbiotic amplicon (AMP/RtrCFN299pc60) in *Rhizobium tropici*. *J. Bacteriol.* 180: (En prensa).

Meade,R.,S.R. Long,G.B. Ruvkun,S.E. Brown and F.M. Ausubel. 1982. Physical and genetical characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149:114-122.

Mekalanos J J. 1983. Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. *Cell* 35:353-363.

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

Mulligan, J. T. and Long, S. R. 1989. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics.* 122: 7-18.

Murphy, P. J., N. Heycke, S. T. Trenz, P. Ratet, F. J. de Bruijin, and J. Schell. 1988. Synthesis of an opine-like compound, a rhizopine, in alfalfa nodules is symbiotically regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9133-9137.

Nap, J. P. and Bisseling, T. 1990. Developmental biology of a plant-prokariote symbiosis: The Legume Root Nodule. *Science.* 150: 948-954.

Narberhaus,F., Krummenacher,P., Fischer, H-M. and H. Hennecke. 1997. Three disparately regulated

genes for sigma³²-like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Microbiol. 24:93-104.

Noel, K.D., Sánchez, F., Fernández, L., Leemans, J. and M.A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158:148-155.

Palacios, R., Brom, S., Dávila, G., Flores, M., Girard, Ma. de L., Romero, D. and Stepkowski, T. 1993. Gene amplification in *Rhizobium*. In: New Horizons in nitrogen Fixation. 581-585. Kluwer Acad. Pub. The Netherlands.

Palacios, R., Flores, M., Hernández, G., Mavingui, P. and Romero, D. 1995. Dynamics of the *Rhizobium* genome. In: Nitrogen Fixation: Fundamentals and applications. I.A. Tikhonovich et al. (eds.) 353-357.

Peterson, B.C. and Rownd, R.H. 1985. Drug resistance gene amplification of plasmid NR1 derivatives with various amounts of resistance determinant DNA. J. Bacteriol. 161:1042-1048.

Plazenet, C., Réfrégile, G., Demont, N., Truchet, G. and Rosenberg, C. 1995. The *Rhizobium meliloti* region located downstream of the *nod* box n6 is involved in the specific nodulation of *Medicago lupina*. FEMS. Microbiol. Letters. 133:285-291.

Priever, U.B., H.J. Burkhardt, W. Klipp and A. Pühler. 1981. ISR1: an insertion element isolated from the soil bacterium *Rhizobium lupini*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45:87-91.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G. and Palacios, R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature. 299: 724-726.

Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M.A., Pardo, M.A., Azpiroz, R., Girard, M.L., Calva, E. and Palacios, R. 1985. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:1170-1174.

Rhijn, P. and Vandeerleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. Microbiol. Rev. 59: 124-142.

Roche, P., Debellé, F., Mailet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Dénarié, J. and Promé, J. C. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-Oligosaccharide signals. Cell. 67: 1131-1143.

Rochepeau, P., Selinger, L.B. and M.F. Hynes. 1997. Transposon-like, structure of a new plasmid-encoded restriction modification system in *Rhizobium leguminosarum* VF395M. Mol. Gen. Genet. 256:387-396.

Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J., and John, M. 1994. Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in N-acylation of the chitooligosaccharide backbone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:3122-3126.

Rolfe, B. G. and P. M. Gresshoff. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 39: 297-319.

Romero, D., Brom, S., Martínez-Salazar, J., Girard, M., Palacios, R. and Dávila. 1991. Amplification and Deletion of a *nod-nif* Region in the Symbiotic Plasmid of *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol. 173: 2435-2441.

Romero, D., Martínez-Salazar, J., Girard, M., Brom, S., Dávila G., Palacios, R., Flores, M. and Rodríguez, C. 1995. Discrete amplifiable regions (Amplicons) in the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42. J. Bacteriol. 177: 973-980.

- Romero,D., and R. Palacios. 1997. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 31:91-111.
- Rostas,K., Kondorosi,E., Horvarth,B., Simoncsits,A., and Kondorosi,A. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:1757-1761.
- Rusanganwa, E., and R. S. Gupta. 1993. Cloning and characterization of multiple groEL chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti*. *Gene* 126:67-75.
- Ruvkun,G.B., and Ausubel,F.M. 1980. Interspecies homology of nitrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:191-195.
- Ruvkun, G.B., V. Sundaresan, and F. Ausubel. 1982. Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29:551-559.
- SanJuan, J., Luka, S., and Stacey, G. 1992. Genetic maps of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *Genetic Maps.* 2.136-2.144.
- Schlaman, H. R. M., Okker, R. J. H. and Lungtenberg, B. J. J. 1992. Regulation of Nodulation Gene Expression by NodD in Rhizobia. *J. Bacteriol.* 174: 5177-5182
- Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buiré, M. and Kondorosi, A. 1994. Cell and Molecular Biology of *Rhizobium*-Plant Interactions. *Internat. Rev. Cyt.* 156: 1-75.
- Schultze, M., Staehelin, C., Röhring, H., John, M., Schmidt, J., Kondorosi, E., Schell, J. and Kondorosi, A. 1995. In vitro sulfotransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein: Lipochitooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 2706 -2709.
- Schwedock, J. S. and Long, S. R. 1992. *Rhizobium meliloti* genes Involved in sulfate activation: The two copies of *nod* PQ and a new locus, *saa*. *Genetics.* 132: 899-909.
- Schwedock,J.S and Long,S.R.1994. An open reading frame downstream of *Rhizobium meliloti nod* Q1 shows nucleotide sequence similarity to an *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 7:151-153
- Scott,K., Hughes,JE., Gresshoff,PM., Beringer. JE., Rolfe, BG and Shine,J. 1982. Molecular cloning of *Rhizobium trifolii* genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:315-326.
- Scott,D.B., C.B. Court., C.W. Ronson., K.F. Scott, J.M. Watson, P.R. Schofield and J. Shine.1984. Organization of nodulation and nitrogen fixation genes on a *Rhizobium trifolii* symbiotic plasmid. *Arch. Microbiol.* 139:151-157.
- Scupham,A.J., Bosworth,A.H., Ellis, w.r., Wacek,T.J., Albrecht,K.A., Triplett,E.W. 1996. Inoculation with *Sinorhizobium meliloti* RMBPC-2 increases alfalfa yield compared with inoculation with a non engineered wild-type strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4260-4262.
- Simon, R, Priefer, U. and Pühler, A. 1983. Vector Plasmids for *in-vivo* and *in-vitro* Manipulations of gram-negative bacteria. *Mol. Gen. Bact. Plant Interact.* 98-106.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.517.
- Spaink, H. P., R. J. H. Okker, C. A. Wijffelman, T. Tak, L. Goosende Roo, E. Pees, A. A. N. van Brussel,

- and B. J. J. Lugtenberg. 1989. Symbiotic properties of rhizobia containing a favonoid - independent hybrid *nod D* product. *J. Bacteriol.* 171: 4045-4053.
- Spaink,H.P., Aarts,A., Stacey,G., Bloemberg,G,V., Lugtenberg,B,J., Kennedy,E.P. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 5:72-80.
- Stark, G. R. and Wahl, G. M. 1984. Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 447-491.
- Stepkowski,T., Flores,M., Brom,S., Romero,D. and R. Palacios. 1993. Amplification and deletion events in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843. In:New Horizons in Nitrogen Fixation. (eds) Palacios R., Mora,J y W.E. Newton. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p:654.
- Török, I., Kondorosi, E., Stepkowski, T., Pósfai, J. and Kondorosi, A. 1984. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Nucl. Acids. Res.* 12: 9509-9524.
- Vincent, J. M. 1970.- A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook, no. 15, Blackwell Scientific Publicaions, LTd. Oxford.
- Watson,J.M. and P.R. Schofield. 1985. Species-specific, symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in *Rhizobium trifolii*. *Mol. Gen. Genet.* 199:279-289.
- Wheatcroft,R. and R.J. Watson.1988. Distribution of insertion sequence ISRM1 in *Rhizobium meliloti* and other gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 134:113-121.
- Whitten, K. W. and Gailey, K. D. 1988. Química General. Interamericana. Mex. 893 pp.
- Williams, J. G. and Patient, R. K. 1990. Genetic engineering. IRL Press. Oxford. 65 pp.