



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION MOLECULAR DE UNA
MUTANTE DE *Rhizobium etli* (CFN030) CON
UNA CAPACIDAD INCREMENTADA DE
FIJACION DE NITROGENO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO

P R E S E N T A

FIDEL ANTONIO VELASCO GONZALEZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES 2004
FACULTAD DE QUIMICA



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Q. F. B. Eduardo Bonilla Espinosa
Secretario	Dr. Juan Miranda Ríos
1er. Suplente	M. en B. Francisco Ruiz Terán
2o. Suplente	M. en B. Beatriz Ruiz Villafán

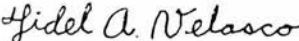
Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio del Dr. Mario Soberón Chávez
Departamento de Microbiología Molecular
Instituto de Biotecnología
UNAM

Asesor


Dr. Juan Miranda Ríos

Sustentante



Fidel Antonio Velasco González

A Arnulfo *f*

Dondequiera que estés . . .

AGRADECIMIENTOS

A Dios, fuente de bondad, de belleza, de fuerza y de amor.

A papá, quien me ha dado todo el amor que necesita un hijo. Mis recuerdos más agradables de la vida inician contigo... Te amo...

A mamá, quien jamás me ha escatimado su amor y su apoyo. Te amo...

A Jorge, mi fiel hermano, a quien cada día quiero más.

Agradezco al Dr. Juan Miranda su confianza, su paciencia y su tiempo, sin los cuales no hubiera sido posible realizar esta tesis. Agradezco al Dr. Mario Soberón su confianza y el espacio brindado en su grupo, así como sus recomendaciones, que mejoraron bastante este trabajo. Gracias a todos mis compañeros: María Luisa, Claudia Morera, Oswaldo, Giovanni, Iván, Isabel, Itzel, Juan Conde, Claudia Pérez, Luisa, Lizbeth, Raúl, Guadalupe, Carlos, Idalia. Gracias a Sergio Blancas y Alejandro Uribe, cuyo apoyo técnico fue muy importante para realizar la tesis, así como a Graciela Domínguez.

A mi Universidad, institución en la que siempre deseé realizar mis estudios, gracias por todo.

Quiero dar gracias a mis profesores; especialmente a José Manuel Méndez, quien nunca dejó de apoyarme durante los últimos años de la licenciatura; y a Alejandro Baeza, con quien hice mis primeros experimentos profesionales. A Margarita, José Manuel y Blas, por su amistad y colaboración durante mi estancia en el laboratorio 201.

Agradezco a la Academia Mexicana de Ciencias la realización de dos estancias de investigación, así como al Dr. Arturo Ponce Balderas, mi tutor en el CINVESTAV. Agradezco el apoyo de la DGEE-PROBETEL para la tesis. Agradezco a la Fundación Telmex el apoyo recibido durante mis años de licenciatura, tanto en lo personal como en lo económico.

Gracias a la familia Morales Garay por su ayuda, sobre todo a mis tíos Conchi y Antonio, que siempre han sido muy generosos conmigo. A toda mi familia, mención aparte de mi tía Olga. Jorgito: ¡Te quiero mucho!

A mis amigos: Ustedes son muy importantes para mí. Con mucho cariño, Edna, Aída, Jimena, Natshelly, Eugenia, Ivonne; Carlos Francisco, Julio, Valente, Josean, Luis Miguel.... GRACIAS, que no puedo mencionarlos a todos, pero a todos los quiero mucho. Gracias a Rodrigo, primero entre iguales; a mi primo Javier, por su amistad permanente; a David Méndez, por su amistad y guía. Gracias a mi equipo de GAMOS.

Y a ti, que te he reservado lo más dulce y afectuoso de mí... Gracias, porque el amor es todo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
1. Situación de la población, la agricultura y la alimentación a nivel mundial	11
2. Desarrollo de tecnologías para satisfacer las necesidades alimenticias	13
3. Importancia del nitrógeno para la vida y la agricultura	14
4. Fijación de nitrógeno	15
4.1. Fijación artificial de nitrógeno	17
4.1.1. Proceso Haber-Bosch (Síntesis de amoníaco para elaborar fertilizantes)	17
4.1.2. Problemas ecológicos de la industria de los fertilizantes	18
a) Contaminación del aire	18
b) Exceso de nitratos en agua potable	19
c) Eutroficación de aguas	19
d) Acidificación de suelos y aguas	19
e) Daños a la biodiversidad	20
f) Contribución al calentamiento global y daños a la capa de ozono	20
4.1.3. Problemas económicos de la industria de los fertilizantes	20
4.2. Fijación natural de nitrógeno	21
4.2.1. Fijación no biológica de nitrógeno	21
4.2.2. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	22
a) Fijación no simbiótica de nitrógeno	23
b) Fijación simbiótica de nitrógeno (FSN)	23
4.3. Las leguminosas y su importancia biológica y económica	25
4.4. Las bacterias rizobiáceas	26
5. Fisiología y bioquímica de la fijación simbiótica de nitrógeno	28
5.1. Proceso de infección, nodulación y formación del bacteroide	28
5.2. Bioquímica de la fijación simbiótica de nitrógeno	29
5.3. Paradoja del oxígeno y estrategias para regular los niveles de oxígeno	31
5.4. Control del oxígeno en los bacteroides simbióticos	33
6. Metabolismo aeróbico	33
6.1. Ciclo de Krebs	35
6.2. Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa	35
6.3. Cadena respiratoria en eucariontes	36
6.4. Cadenas respiratorias en bacterias	36
6.5. Cadenas respiratorias en bacterias rizobiáceas	38
6.6. Importancia del estudio de la cadena respiratoria	42
7. Regulación genética de la fijación simbiótica de nitrógeno	43
7.1. Regulones conservados	44
7.2. NifA	44

7.3. FixLJ	45
7.4. Sistemas globales de regulación	46
7.4.1. Arc	46
7.4.2. Fnr	46
7.5. Regulación de la expresión de la oxidasa terminal cbb_3 (<i>fixNOQP</i>)	47
8. Panorama de las investigaciones en bacterias rizobiáceas	48
9. Futuro de las investigaciones sobre la FSN	53
ANTECEDENTES	54
OBJETIVO GENERAL	57
OBJETIVOS PARTICULARES	57
MATERIAL Y MÉTODOS	58
Cepas y plásmidos	58
Medios y condiciones de cultivo	59
Clonación genética	59
Secuenciación de nucleótidos	60
Análisis de la secuencia	60
Complementación genética	61
RESULTADOS	62
Caracterización del gene afectado por la inserción del Tn5- <i>mob</i> en la cepa CFN030	62
Clonación del gene silvestre que fue mutado por la inserción del Tn5- <i>mob</i>	63
Secuencia nucleotídica	66
Análisis de la secuencia	71
ORF 1	72
ORF 2	74
ORF 3 / ORF 4 / ORF 5	74
ORF 6	75
Complementación genética	77
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	88
PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	89
PERSPECTIVAS GENERALES	90
BIBLIOGRAFÍA	91

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARA	actividad reductora de acetileno
Ap	ampicilina
ATP	trifosfato de adenosina
Az	azida
Az ^R	fenotipo resistente a azida
Az ^S	fenotipo sensible a azida
CTE	cadena de transporte de electrones
FAD	flavin adenin dinucleótido
FBN	fijación biológica de nitrógeno
FMN	flavin adenin mononucleótido
FSN	fijación simbiótica de nitrógeno
FTN	fijación total de nitrógeno
GTP	trifosfato de guanosina
Ha	hectárea
HCO	familia de oxidasas hemocúpricas
kb	kilobases
kg	kilogramo
Km	kanamicina
L	litro
mg	miligramo
mL	mililitro
mM	milimolar
MM	medio mínimo
MTg	millones de toneladas métricas
N	nitrógeno
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
Nal	ácido nalidíxico
nM	nanomolar
NTP	nucleótidos trifosfatados
ORF	marco abierto de lectura
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
Sm	estreptomomicina
Tc	tetraciclina
Tg	tonelada métrica
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina
TTB	bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
US \$	dólares americanos
X ^R	resistente al antibiótico X (Ap, Km, Nal, Sm, Tc)
ΔG	energía libre de Gibbs
μg	microgramo
μM	micromolar

RESUMEN

En este trabajo se presenta la caracterización a nivel molecular de una cepa mutante de *Rhizobium etli* (CFN030) con una expresión alterada de su cadena respiratoria y una capacidad incrementada de fijación de nitrógeno en simbiosis con el frijol (*Phaseolus vulgaris*). La cepa mutante CFN030 fue obtenida por mutagénesis con el transposón Tn5-*mob* y fue aislada por presentar un fenotipo resistente a azida de sodio. Esta mutante sufrió la inserción del Tn5-*mob* en el cromosoma, y presenta mayores actividades respiratorias en cultivos microaeróbicos, así como una fijación simbiótica de nitrógeno aumentada. En estudios espectroscópicos realizados con esta cepa, se observa una expresión derreprimida del citocromo aa₃ en cultivos microaeróbicos, junto con la expresión en vida libre del citocromo cbb₃, cuya expresión no ocurre en la cepa silvestre, excepto durante la simbiosis (Miranda *et al.*, 1996, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 182-188).

Se realizaron hibridaciones tipo Southern para localizar la inserción del transposón en la cepa CFN030, con el propósito de identificar y clonar el gene mutado por la inserción del Tn5-*mob*. A partir del ADN genómico de la cepa CFN030, se aisló un fragmento *Sal* I de 3 kb que contiene 527 pb de ADN silvestre junto con el gene del Tn5-*mob* que imparte resistencia a kanamicina. Este fragmento *Sal* I fue clonado en el vector pSK, y se empleó como sonda para buscar en un banco de cósmidos (que contiene el ADN genómico de *R. etli*) la región mutada por la inserción del transposón. La hibridación correspondiente reveló que la zona donde ocurrió la inserción del Tn5-*mob* se trata de un fragmento *Eco*RI de 5 kb, contenido en el cósmido 6.63. Este fragmento *Eco*RI fue aislado del cósmido 6.63 y clonado en el vector pSK. La nueva clona recibió el nombre de pFV.

Para realizar la caracterización molecular de la cepa CFN030, se secuenció parte del plásmido pFV. La secuencia fue analizada con ayuda de programas informáticos, para detectar marcos abiertos de lectura (ORFs). Se realizaron búsquedas de homologías de dichos ORFs con la información genética de otros microorganismos, disponible en bases de datos.

El análisis de la secuencia reveló 6 ORFs. En la búsqueda de homologías se encontró que el ORF 1 presenta un motivo correspondiente a una familia de proteínas que unen GTP y otros nucleótidos fosfatados. El ORF 6 presenta homología con proteínas de varios microorganismos,

las cuales contienen varios residuos de cisteína conservados, lo que hace pensar que se trata de una familia de proteínas aún no descrita. Los demás ORFs no presentan homologías, por lo que se trata de genes nuevos. El ORF 2, en caso de existir, sería un gene solitario. Dentro de estos ORFs destacan los ORFs 4 y 5. Dada la continuidad de los genes en la secuencia, se piensa que los ORFs 3, 4 y 5 puedan estar organizados como un operón. La inserción del Tn5-*mob* ocurrió al inicio del ORF 4, por lo que posiblemente este gene sí exista y tenga una función específica, que fue alterada por la inserción del transposón. También es posible la existencia del ORF 5. Se realizaron experimentos de complementación genética, en los que se observó que el fenotipo mutante (alta resistencia a azida de sodio) es dominante aún al complementar la región mutada con el plásmido pFV, que contiene el fragmento *EcoRI* de 5 kb. Dicha dominancia sugiere una expresión constitutiva del ORF 5 (o del ORF 4, o de ambos), debido a que los ORFs en cuestión posiblemente se estén transcribiendo a partir de un promotor interno del Tn5-*mob*.

El hecho de que estos genes no han sido reportados en la literatura, sugiere que se trata de genes nuevos, cuyo estudio podría contribuir al conocimiento de la fijación simbiótica de nitrógeno.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda mundial de alimentos, así como los daños que el hombre ha causado al medio ambiente debido a un empleo inmoderado de fertilizantes, han estimulado la investigación en todo el mundo sobre la fijación simbiótica de nitrógeno. Los conocimientos sobre este proceso podrían contribuir a elevar la productividad en el campo y desarrollar prácticas agrícolas sustentables, por lo que es importante entender bien la genética de dicho proceso. En el laboratorio del Dr. Mario Soberón se obtuvo una cepa mutante de *Rhizobium etli* (CFN030) con una capacidad incrementada de fijación de nitrógeno, cuya caracterización molecular es el tema de esta tesis. La caracterización molecular consistió en la clonación y secuenciación de la región genética mutada, con un análisis de las posibles regiones codificadoras y la búsqueda de genes homólogos en bancos de información genética.

En esta introducción se presenta la situación actual de la población y la agricultura a nivel mundial, así como la manera en que se han mejorado las prácticas agrícolas gracias a la investigación científica y el desarrollo tecnológico. Posteriormente, se explica la importancia del nitrógeno para la vida, y se revisa el proceso de fijación de nitrógeno en todas sus formas. Al estudiar la bioquímica de la fijación simbiótica de nitrógeno, se profundiza en el metabolismo aeróbico de las bacterias, dado que la cepa CFN030 presenta alteraciones en su cadena respiratoria que posiblemente estén muy relacionadas con el aumento en su capacidad de fijación de nitrógeno. Al final de la introducción se sintetiza el estado actual de las investigaciones sobre las bacterias rizobiáceas, incluyendo proyectos de secuenciación genómica, y se analiza la posibilidad de mejorar la producción agrícola mediante la manipulación genética de la fijación de nitrógeno.

1. Situación de la población, la agricultura y la alimentación a nivel mundial

El siglo XX fue un siglo de crecimiento demográfico, desarrollo económico y problemas ambientales sin precedentes (United Nations, 2001). Entre 1900 y 2000, la población mundial aumentó de 1,600 a 6,100 millones de habitantes, ocurriendo el 50% de este aumento después de 1960 (Alexandratos, 1999). La tasa de crecimiento actual es de 1.4%, por lo que cada año se suman 84 millones de habitantes. Con esta tasa de crecimiento la población podría aumentar a 8,300 millones de habitantes en el año 2030 (e inclusive hasta 12,000 millones de habitantes en un lapso de 50 años), viviendo el 80% en países en vías de desarrollo (Alexandratos, 2003). La explosión demográfica ha incrementado la demanda de bienes y servicios, lo cual se traduce en un consumo creciente de alimentos y energía, así como un impacto negativo sobre el medio ambiente. Para hacer frente a estos problemas, se necesita conocimiento científico capaz de generar tecnologías que conduzcan a un desarrollo sustentable¹, además de diseñar políticas socioeconómicas dirigidas a proteger el medio ambiente, combatir la pobreza y la desigualdad económica.

La situación económica mundial ha cambiado de forma muy drástica en los últimos años. Los países en vías de desarrollo han dejado de ser exportadores para convertirse en importadores de alimentos (como cereales, azúcar y carne) y materias primas (como hule, petróleo y urea), además de que ha disminuido el valor en el mercado de algunos de sus principales productos de exportación (como el café). Los gobiernos de Estados Unidos y la Unión Europea subsidian las exportaciones de alimentos e imponen aranceles a las importaciones, lo cual tiene repercusiones económicas negativas en la distribución mundial de alimentos (Alexandratos, 2003). La competencia por el mercado global entre Estados Unidos y la Unión Europea a través de una

¹ El desarrollo sustentable fue definido en 1987 como “el desarrollo que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades” (United Nations, 2001). La agricultura sustentable implica atender tres objetivos fundamentales: la salud del medio ambiente, la viabilidad económica, y la equidad social y económica, a través de la adopción de sistemas agrícolas capaces de mantener su productividad indefinidamente (Herrera *et al.*, 2001). Las prácticas agrícolas sustentables tienen un papel básico en la generación del crecimiento económico (Mathot, 2003), y es tal su importancia que el año pasado la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) celebró una conferencia mundial sobre fertilizantes y desarrollo sustentable, en cooperación con la Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes (IFA) (IFA-FAO Agriculture Conference "Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization", Roma, Italia, 26-28 de marzo de 2003).

guerra de subsidios es una práctica que impide la entrada al mercado de los países en vías de desarrollo, además de significar un alto costo fiscal para los gobiernos de los países desarrollados, pues las exportaciones se mantienen gracias a las subvenciones del erario. En los años noventa el Banco Mundial estimó que los subsidios y restricciones a la importación de alimentos representaban un gasto irrecuperable de US \$100,000 millones anuales para los contribuyentes de unos 20 países desarrollados (Wonnacott y Wonnacott, 1992). Además, a medida que continúe en declive el precio de los alimentos, los gobiernos tendrán que incrementar los subsidios.

En las últimas tres décadas, la producción mundial de alimentos se ha decuplicado, pasando de 20 MTg anuales en el período 1968-1970 a 212 MTg anuales en 1998. Si bien esta enorme productividad podría satisfacer las necesidades de la población mundial, en realidad no ha resuelto el problema del hambre, y ha provocado una caída en los precios de los alimentos (*cfr.* Alexandratos, 1999):

a) En 1996 el trigo tenía un valor de US \$210/Tg, mientras que en 1998 el precio se redujo a US \$126/Tg. El precio de los alimentos desciende mientras ocurre un aumento en el precio de otros factores de la producción como fertilizantes y maquinaria. Esto empobrece a los pequeños productores y repercute en la economía global, pues los gobiernos se ven obligados a subsidiar a los agricultores y almacenar los excedentes de la producción.

b) La demanda mundial de alimentos ha disminuido significativamente debido a una pérdida de poder adquisitivo de la población. Así, cada vez hay una mayor oferta de alimentos que no llegan a la mesa de quien más los necesita.

En el caso de México, el aumento demográfico no ha sido acorde con un aumento en la producción alimentaria, por lo que nuestro país se ha convertido en un importador de alimentos básicos como frijol, maíz y trigo (Rocha y De Las Peñas, 1990). Al cierre del año 2001, la balanza comercial agropecuaria y pesquera presentó un déficit por US \$1,117 millones, debido al incremento de 6.9% en la importación de productos agropecuarios y pesqueros, y a la disminución de 4.8% en las exportaciones. Esta tendencia se revirtió en el 2002, con un saldo positivo de dicha balanza comercial por US \$44 millones al reducirse las importaciones (SAGARPA, 2002). Nuestro país atraviesa una severa crisis del campo,

la cual tiene numerosas consecuencias negativas como la sustitución de productos nacionales por importados, déficit en la balanza comercial, desempleo y migración, etc.

2. Desarrollo de tecnologías para satisfacer las necesidades alimenticias

El gran crecimiento demográfico vivido en los últimos 50 años motivó la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías para aumentar la producción mundial de alimentos. Un movimiento importante fue la Revolución Verde², que introdujo cambios substanciales en las prácticas agrícolas: nuevas técnicas de mecanización e irrigación, amplio uso de fertilizantes y pesticidas, desarrollo y cultivo de variedades híbridas más productivas. La Revolución Verde permitió incrementar drásticamente la producción mundial de alimentos y combatir el hambre en países como China, India y Pakistán (Parks, 2003).

No obstante los resultados obtenidos, los cambios introducidos por la Revolución Verde han propiciado otros problemas, como la amenaza a la diversidad genética de las especies y el uso extensivo de fertilizantes. La agricultura se ha vuelto dependiente de los fertilizantes sintéticos, y su uso indiscriminado ha provocado daños al medio ambiente (los problemas propiciados por los fertilizantes, así como la crisis que atraviesa esta industria, se explicarán más adelante). Estas limitaciones plantean la necesidad de continuar la investigación científica y el desarrollo tecnológico necesarios para poder resolver dichos problemas. Sin embargo, el uso de nuevas tecnologías no es suficiente para solucionar el problema de la alimentación. Es necesario tomar decisiones políticas y económicas adecuadas para el bienestar de la población mundial.

Una tecnología desarrollada recientemente es la biotecnología de plantas, basada en el uso de la ingeniería genética para crear organismos modificados genéticamente (también conocidos como organismos transgénicos o **GMO**, **Genetically Modified Organisms**). La ingeniería

² "Revolución Verde" es un término usado desde los años sesenta para describir los esfuerzos realizados por fundaciones de carácter privado y gobiernos de países en vías de desarrollo, con miras a mejorar la agricultura en dichos países. Uno de los científicos más destacados es Norman Ernest Borlaug, quien desde 1944 realizó investigaciones auspiciadas por la Fundación Rockefeller en México. Borlaug y su equipo desarrollaron híbridos vegetales, de los cuales destaca el "trigo enano", una variedad con mayor cantidad de proteína y mayor rendimiento en cultivos. Esta semilla permitió elevar la producción de trigo en México de 300,000 Tg en 1950 a 2.6 MTg en 1970. Por sus investigaciones, Borlaug recibió el Premio Nobel de la Paz en 1970.

genética aplicada a la biotecnología de plantas tiene como objetivo elevar la productividad, reducir costos de producción y mejorar la calidad de los alimentos (Xoconostle y Ruiz, 2002). La biotecnología de plantas ha modificado la agricultura al permitir desarrollar especies resistentes a pesticidas, a herbicidas y a enfermedades. Algunos de los organismos modificados genéticamente son la soya, el maíz, el algodón, el tomate, el arroz, el tabaco, la canela y la papa (actualmente, la soya transgénica ocupa más del 40% de los cultivos totales de soya en Estados Unidos, mientras que el maíz transgénico ocupa más de la tercera parte de los cultivos en dicho país). El desarrollo inicial de la biotecnología de plantas fue hecho en el sector académico, y hoy en día las principales investigaciones biotecnológicas son conducidas por empresas como Monsanto, DuPont y Novartis (Kishore y Shewmaker, 1999; Herrera *et al.*, 2001; Cruz, 2002).

Los conocimientos generados por esta nueva tecnología serán determinantes para el futuro, por lo que es fundamental que los países en vías de desarrollo efectúen sus propias investigaciones biotecnológicas, para poder satisfacer las necesidades de su población. En México, 60 dependencias de distintas instituciones trabajan en investigación y desarrollo en biotecnología vegetal, estudiando diversos campos como la propagación *in vitro* de plantas, la conservación del germoplasma, el mejoramiento genético, la fijación de nitrógeno y las relaciones con microorganismos patógenos. Se estudian 80 especies, principalmente: maíz, frijol, chile, papa, tomate y coco (Herrera *et al.*, 2001).

3. Importancia del nitrógeno para la vida y la agricultura

En 1843, Lawes y Gilberts dieron a conocer que el nitrógeno era el recurso limitante del crecimiento de las plantas, en forma de nitratos o amonio (Fowden, 1979). Entre 1886 y 1888, Hellriegel y Wilfarth publicaron que ciertas bacterias participaban en la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al.*, 2002). En 1888, Martinus W. Beijerinck aisló el microorganismo responsable de la nodulación de plantas leguminosas, llamándolo *Bacillus radicicola*. En 1889, Frank renombró a esta bacteria *Rhizobium* (Wang *et al.*, 2001).

El nitrógeno es un componente esencial para la vida, al formar parte de moléculas como los ácidos nucleicos, las proteínas, las hormonas y las porfirinas. No obstante su importancia capital, el nitrógeno no puede ser aprovechado de la atmósfera por los organismos eucariontes, de modo que las plantas dependen de otras fuentes para poder utilizar el nitrógeno

(bacterias fijadoras de nitrógeno, abonos, fertilizantes de origen químico, etc.) (Vance, 1998). Cada persona necesita consumir anualmente al menos 3 kg de N (Frink *et al.*, 1999).

Después de la fotosíntesis, la adquisición y asimilación de nitrógeno es la función bioquímica más importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Oláh *et al.*, 2001). En general, el nitrógeno es el nutriente que limita el crecimiento de las plantas, aunque bajo ciertas condiciones los nutrientes limitantes pueden ser agua o fósforo (Atlas y Bartha, 1998).

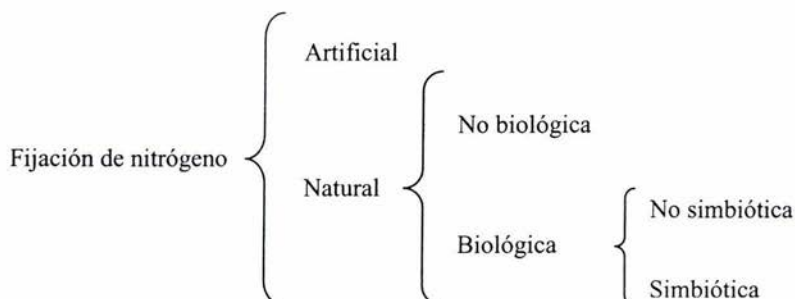
4. Fijación de nitrógeno

Para que los seres vivos puedan aprovechar el nitrógeno presente en el medio ambiente, este elemento debe ser metabolizado y absorbido por las plantas, de donde es distribuido a través de las cadenas y redes tróficas. El nitrógeno molecular (N_2) es un gas inerte que no puede ser aprovechado directamente (de ahí su nombre de *azote*, sin vida), así que primero debe ser reducido a otras especies químicas, como amoníaco (NH_3), nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-). A partir de estos compuestos inorgánicos los seres vivos pueden sintetizar diversos compuestos orgánicos como urea, ácido úrico, aminoácidos y ácidos nucleicos.

La conversión de nitrógeno molecular a estas formas químicas recibe el nombre de **fijación de nitrógeno**, y el nitrógeno agrupado en dichas especies químicas (NH_3/NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) recibe el nombre de **nitrógeno fijado**. El N_2 posee un triple enlace muy estable (945 kJ/mol o 226 kcal/mol), que requiere mucha energía para fragmentarse, por lo que la fijación de nitrógeno tiene un elevado costo energético (Huheey *et al.*, 1997).

La fijación de nitrógeno se divide en varios rubros (tabla 1).

Tabla 1. Formas en que se lleva a cabo la fijación de nitrógeno.



No se tienen cálculos exactos, pero se estima que anualmente son fijadas más de 250 MTg de N, tanto en forma natural como artificial. En las tablas 2 y 3 se presentan las cantidades anuales de nitrógeno fijado en cada rubro.

Tabla 2. Cantidades globales de nitrógeno fijadas en forma artificial y natural.

Total de N fijado: 250 MTg

Proceso de fijación	Toneladas anuales de N	Porcentaje
Fijación artificial de nitrógeno (proceso industrial Haber-Bosch)	80 MTg	32%
Fijación no biológica (efectuada por rayos atmosféricos)	20 MTg	8%
Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	150 MTg	60%

Tabla 3. Cantidades globales de nitrógeno fijadas en forma biológica.

FBN: Fijación biológica de nitrógeno (150 MTg anuales)

FSN: Fijación simbiótica de nitrógeno (120 MTg anuales)

FTN: Fijación total de nitrógeno (250 MTg anuales)

Proceso de la FBN	Toneladas anuales de N	Porcentaje
Fijación no simbiótica (microorganismos de vida libre)	30 MTg	20% de la FBN 12% de la FTN
Fijación simbiótica realizada por bacterias de la familia <i>Rhizobiaceae</i>	90 MTg	60% de la FBN 75% de la FSN 36% de la FTN
Fijación simbiótica realizada por otras bacterias	30 MTg	20% de la FBN 25% de la FSN 12% de la FTN

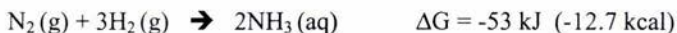
4.1. Fijación artificial de nitrógeno

4.1.1. Proceso Haber-Bosch (Síntesis de amoníaco para elaborar fertilizantes)

Más de 95 MTg de N en forma de NH₃ son sintetizadas anualmente mediante este proceso, de las cuales 80 MTg de N son empleadas directamente para la manufactura de fertilizantes químicos (Socolow, 1999). Esta última cantidad representa prácticamente la tercera parte del N total fijado en el planeta, equivalente a US \$40,000 millones, constituyendo entre 4 y 8% del comercio mundial de productos y materias primas (Mathot, 2003).

El proceso Haber-Bosch fue desarrollado por los químicos Fritz Haber y Carl Bosch para la empresa BASF³. El amoníaco producido inicialmente sirvió como materia prima de explosivos para la Primera Guerra Mundial (Zuberer, 1998; Frink *et al.*, 1999).

El proceso Haber-Bosch consiste en la síntesis química del NH₃ a partir de N₂ (proveniente de la destilación del aire líquido) e H₂ (proveniente del gas natural). La reacción de síntesis es la siguiente:



Pese a ser una reacción exotérmica, se requiere una gran cantidad de energía para poder romper el triple enlace del nitrógeno (226 kcal/mol), por lo que son necesarias presiones de 200 atmósferas y temperaturas de 400-500°C, además de emplear un catalizador formado por una aleación de óxidos de hierro, potasio y aluminio (Huheey *et al.*, 1997; Zuberer, 1998). Estas condiciones tan drásticas significan un consumo adicional de combustibles fósiles destinado al calentamiento del reactor. En 1986 se requerían 875 metros cúbicos de gas natural, 2 toneladas de carbón o 5.5 barriles de petróleo para fijar una tonelada de amoníaco (Dixon y Wheeler, 1986). Se han logrado mejoras significativas en la eficiencia de este proceso, la producción actual de amoníaco consume la mitad de energía empleada en los años 60 (Mathot, 2003).

Una vez producido, el amoníaco es convertido a urea y sales de amonio, fosfatos y nitratos granulados, para su comercialización como fertilizantes. La producción mundial de amoníaco sólo es rebasada por la producción de ácido sulfúrico. 15 MTg de amoníaco se destinan a la manufactura de ácido nítrico, fibras, plásticos, detergentes y explosivos.

³ Fritz Haber ideó la síntesis química del proceso en 1908, mientras que Carl Bosch impulsó el funcionamiento de la primera planta de amoníaco en Oppau, Alemania, en 1914. Haber recibió el Premio Nobel de Química en 1918, y Bosch recibió dicho galardón en 1931 (Bernard, 1995).

El fertilizante principal, la urea, se emplea como alimento para el ganado y como materia prima para otros procesos químicos (Bernard, 1995).

En 1930 la producción mundial de fertilizantes de N fue de 1.3 MTg (Frink *et al.*, 1999), mientras que en 2001 alcanzó 82.2 MTg (Mathot, 2003). Se espera que en los próximos 30 años la demanda de fertilizantes aumente en 50 MTg (Alexandratos, 2003).

4.1.2. Problemas ecológicos de la industria de los fertilizantes

Pese a haber aumentado notablemente la producción agrícola, el empleo indiscriminado de fertilizantes químicos presenta numerosas desventajas, ya que buena parte de los fertilizantes no son aprovechados por las plantas y se diseminan a los ecosistemas (Wang *et al.*, 2001).

El NH_3 es susceptible a transformaciones químicas, generándose subproductos como dióxido de nitrógeno (NO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), y los llamados óxidos de nitrógeno (NO_x): óxido nitroso (N_2O) y óxido nítrico (NO). Dichos subproductos se distribuyen por toda la biósfera, provocando numerosos daños a la capa de ozono, a la biodiversidad y a la salud humana (tabla 4).

Tabla 4. Principales efectos negativos del uso indiscriminado de fertilizantes.
(Fuente: Socolow, 1999)

Efectos regionales	{	Contaminación del aire	}	Daños a la salud humana
		Exceso de nitratos en agua potable		
Efectos globales	{	Eutroficación de aguas	}	Daños al medio ambiente
		Acidificación de suelos y aguas		
		Amenaza a la biodiversidad		
		Contribución al calentamiento global		
		Daños a la capa de ozono		

a) Contaminación del aire

El NH_3 y los NO_x estimulan la formación de smog al controlar la producción de ozono troposférico y ser precursores de partículas nocivas para el aparato respiratorio (Socolow, 1999).

b) Exceso de nitratos en agua potable

Los nitratos se filtran al subsuelo, provocando salinización de los mantos acuíferos. El consumo de aguas con alto contenido de nitratos (concentraciones mayores a 10 mg/L) está asociado a la metahemoglobinemia ("síndrome de los bebés azules"), una cianosis que afecta principalmente a los niños menores de seis meses. El nitrato es metabolizado a nitrito en el tracto gastrointestinal de los infantes. El ion nitrito inactiva la hemoglobina en la sangre, limitando la disponibilidad de oxígeno, lo que puede provocar diarreas, infecciones agudas recurrentes del tracto respiratorio, y en algunos casos la muerte (Gupta *et al.*, 2000 y 2001).

c) Eutroficación de aguas

Al eliminarse por aguas de drenaje, los nitratos aceleran la eutroficación de ríos y lagos (Jensen y Hauggaard-Nielsen, 2003). La eutroficación es un fenómeno provocado al añadir un exceso de nutrientes (como nitratos y fosfatos) a un ecosistema acuático. El exceso de nutrientes produce un crecimiento desmedido de algas, lo que disminuye la concentración del oxígeno disuelto en agua, con la muerte consiguiente de los organismos superiores del hábitat (Alexander *et al.*, 1992).

Los ríos conducen los nitratos al mar, donde se acumulan principalmente en estuarios y bahías, desarrollándose zonas carentes de vida (Socolow, 1999). Se tienen casos bien documentados al respecto, como la existencia de una zona hipóxica de 13,000 kilómetros cuadrados en el Golfo de México, al sur de Louisiana, causada por la agricultura en torno al río Mississippi (Malakoff, 1998).

d) Acidificación de suelos y aguas

Los óxidos de nitrógeno emitidos a la atmósfera, se oxidan a ácido nítrico (HNO_3), contribuyendo a la lluvia ácida (Vance, 1998).

Los nitratos provocan acidificación del suelo, disminuyendo la capacidad de retención de humedad, el contenido de materia orgánica, y en general, la fertilidad del suelo (Norse, 2003). Esto constituye un círculo vicioso; al empobrecerse el suelo, ese necesario aplicar más fertilizantes.

e) Daños a la biodiversidad

El cambio en el pH de suelos y aguas causa daños a la diversidad biológica. La lluvia ácida ha terminado con las poblaciones de peces en muchos lagos de Europa, Estados Unidos y Canadá (Brown *et al.*, 1993). Una acidificación acentuada del suelo disminuye la competitividad de las especies bacterianas indígenas, y aumenta la toxicidad de compuestos de aluminio (Frink *et al.*, 1999; Jensen y Hauggaard-Nielsen, 2003). En este aspecto, la introducción de bacterias rizobiáceas resistentes a la acidez puede mejorar la fertilidad del suelo, como ha ocurrido en Brasil y Australia (Sessitsch *et al.*, 2002).

f) Contribución al calentamiento global y daños a la capa de ozono

Un efecto indirecto del uso de fertilizantes es el agotamiento de recursos no renovables como gas natural y petróleo. El CO₂ emitido por la combustión de estos recursos contribuye al calentamiento global, y se estima que el uso de fertilizantes contribuye en 1% a las emisiones antropogénicas globales de CO₂ (Vance, 1998; Jensen y Hauggaard-Nielsen, 2003).

El N₂O está ampliamente reconocido como un gas de efecto invernadero con un tiempo de residencia en la atmósfera de 120 años. El NO (uno de sus subproductos) actúa como catalizador en la destrucción del ozono estratosférico (Socolow, 1999).

Pese a sus desventajas, la agricultura se ha vuelto muy dependiente de los fertilizantes químicos, siendo imposible evitar su uso sin producir hambrunas. Tampoco es conveniente eliminar el empleo de fertilizantes químicos: se sabe que la productividad agrícola aumenta al máximo al combinar fertilizantes de origen natural y de origen sintético (Doyle, 2003).

4.1.3. Problemas económicos de la industria de los fertilizantes

Aunque se ha mejorado la eficiencia del proceso Haber-Bosch, los costos de la producción siguen siendo elevados y están ligados a los precios del petróleo. El consumo de petróleo representa 75% del precio de venta de los fertilizantes (Bernard, 1995). Postgate estimó que los costos de la materia prima (metano, obtenido del gas natural) y del transporte se volverían prohibitivos (Postgate, 1987). Esto ha sido completamente cierto.

En todo el mundo, la producción y aplicación de fertilizantes está disminuyendo, debido al aumento en los costos del petróleo y del gas natural⁴.

En México la situación es particularmente grave. Nuestro país, que hace veinte años era autosuficiente en producción de fertilizantes e incluso tenía excedentes para exportar, actualmente importa fertilizantes. La industria está en bancarota: Pemex ha cerrado las plantas productoras de amoníaco de los complejos Salamanca y Camargo (Ortega, 1999), y ha disminuido significativamente la producción de amoníaco en el complejo Cosoleacaque, que en 1981 era "el principal productor mundial de amoníaco" (*sic*) (Pemex, 1988). En mayo de 1999 se detuvo la producción nacional de urea (World Bank, 2000), importándose urea de menor calidad y precio que la nacional, procedente de países como Rusia o Ucrania (Ortega, 1999). Una publicación del Banco Mundial menciona que la producción nacional de urea se reiniciaría tras lograrse un acuerdo entre Pemex, la Secretaría de Energía y el sector privado de la petroquímica, pero no se tiene información al respecto (World Bank, 2000).

Los problemas económicos y ecológicos que enfrenta la industria de los fertilizantes, constituyen una razón adicional para buscar explotar de una mejor forma la fijación biológica de nitrógeno mediante la biotecnología (Postgate, 1987). Estos problemas también estimulan la investigación en otras áreas, como el área de catálisis, donde se están diseñando catalizadores más eficientes que los actualmente usados en el proceso Haber-Bosch, empleando metales de transición como titanio, molibdeno y tungsteno (Bernard, 1995).

4.2. Fijación natural de nitrógeno

4.2.1. Fijación no biológica de nitrógeno

Entre 8 y 10 % de la fijación total de nitrógeno (20-25 MTg) ocurre en la atmósfera, mediante un proceso en el que el nitrógeno molecular (N_2) se convierte en óxidos nitrogenados (NO_x) gracias a la alta energía de los relámpagos (Dickson, 1980). Parece que la radiación ultravioleta también participa en este proceso. El nitrógeno fijado se transporta a la superficie terrestre por medio de la lluvia (Vance, 1998).

⁴ El consumo de fertilizantes varía según las condiciones de cultivo, pero el uso promedio en cereales es de 200 a 300 kg/Ha, siendo un gasto total de US\$ 80 a US\$ 150 por hectárea (cada kilogramo de fertilizantes cuesta entre 40 y 50 centavos de dólar) (Sessitsch *et al.*, 2002).

4.2.2. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

El 60% restante de la fijación total de nitrógeno (150 MTg) lo llevan a cabo seres vivos, de donde deriva la importancia de cuidar los ecosistemas y estudiar este proceso (Vance, 1998). A los microorganismos capaces de fijar el nitrógeno se les denomina **diazótrofos**.

La manera general en que las plantas convierten el nitrógeno elemental en nitrógeno biológico es la siguiente: Las bacterias diazótrofes convierten el nitrógeno elemental en amoníaco. Las plantas absorben el amoníaco del suelo y lo transforman en aminoácidos, proteínas y otros compuestos nitrogenados. Por estas razones es vital restaurar el nitrógeno al suelo, como se ha hecho tradicionalmente con la rotación de cultivos y el empleo de abonos, y en el siglo XX con el uso de fertilizantes químicos. Ciertas plantas, como las leguminosas, tienen la capacidad de fijar nitrógeno con ayuda de las bacterias que viven en sus raíces. Esta forma de fijar el nitrógeno (FSN: fijación simbiótica de nitrógeno) es particularmente importante, y se explicará más adelante.

La fijación biológica de nitrógeno puede resumirse en la siguiente ecuación:



Como puede observarse, los costos energéticos de la fijación de nitrógeno son altos. Dependiendo del tipo de organismo diazótrofo, para convertir una molécula de N_2 a dos de NH_3 los requerimientos de energía varían entre 12 y 35 moléculas de ATP (McKee y McKee, 1996). Este proceso no se desempeña de modo ideal; se sabe que en el caso de muchas bacterias rizobiáceas, sólo 40 a 60% del flujo de electrones dentro del complejo nitrogenasa es utilizado para reducir el nitrógeno, mientras que el resto se pierde mediante la formación de hidrógeno, disminuyendo significativamente la eficiencia (Glick y Pasternak, 1998). Además del ATP, la reducción de N_2 a NH_3 requiere una fuente de poder reductor: De -400 a -500 milivolt por mol de N_2 fijado a pH 7 (Burris, 1991). Esta fuente de poder reductor son electrones de bajo potencial provenientes de nucleótidos de piridina sintetizados a partir de piruvato, o flavoproteínas como la ferredoxina (Hall *et al.*, 1981).

Las fuentes de nitrógeno inorgánico utilizadas por las plantas se restringen al nitrato y al amoníaco. El amoníaco puede usarse de manera directa (en pH menor a 9.3 el amoníaco está presente como amonio, NH_4^+), u oxidarse a nitrato antes de ser absorbido por las raíces. Cuando el nitrógeno es ingerido como nitrato, la planta lo reduce a nitrito y a amoníaco

sucesivamente, antes de ser incorporado (Hall *et al.*, 1981). El amoníaco es transportado a la célula hospedera y convertido a asparagina. Este aminoácido es transportado al tallo, de donde se distribuye a toda la planta (Graham, 1998).

La FBN es un proceso exclusivo de unas cuantas especies procariontes, porque sólo algunas de ellas poseen la enzima que cataliza la reducción del nitrógeno molecular a amoníaco, el complejo nitrogenasa. De más de 10,000 géneros conocidos de bacterias, solamente cerca de cien géneros contienen especies diazótrofes (Zuberer, 1998). Estos organismos se encuentran tanto en vida libre como en simbiosis; unos son autótrofos mientras otros son heterótrofos. Pese a su importancia para la vida, la fijación biológica de nitrógeno es un proceso bioquímico y fisiológico muy complejo, que no se ha entendido bien.

a) Fijación no simbiótica de nitrógeno

La fijación de nitrógeno la efectúan tanto organismos simbióticos como no simbióticos. Las bacterias fijadoras de vida libre se encuentran en hábitats muy diversos: suelos, sedimentos marinos, superficies de las hojas y del tronco de árboles, y en el tracto intestinal de varios animales. Las hay aeróbicas (*Azotobacter*, *Beijerinckia*), anaeróbicas facultativas (*Bacillus*, *Klebsiella*) y anaeróbicas estrictas (*Clostridium*, *Methanococcus*). Algunas son no fotosintéticas (*Clostridium*) mientras que otras son fotosintéticas (*Chromatium*, *Rhodospirillum*). Las cianobacterias que fijan nitrógeno están representadas principalmente por los géneros *Nostoc*, *Anabaena*, *Lyngbia* y *Calothrix*.

Se estima que los organismos no simbióticos fijan anualmente 30 MTg (20% del total del nitrógeno fijado biológicamente).

b) Fijación simbiótica de nitrógeno (FSN)

La FSN es la fuente principal de este elemento para la biósfera. No se tienen cálculos exactos, pero se estima que la FSN aporta 120 MTg anuales, casi la mitad del nitrógeno requerido para la agricultura. Esta fijación es efectuada por microorganismos que establecen una simbiosis con plantas, donde el microorganismo aporta el nitrógeno a la planta, y a cambio recibe energía del vegetal (en forma de carbohidratos, principalmente) para realizar sus funciones biológicas (Vance, 1998).

La mayoría de asociaciones simbióticas resultan en la formación de estructuras multicelulares alargadas llamadas nódulos, ubicados en la raíz y ocasionalmente en el tallo del organismo hospedero. Se conocen más de 170 especies de plantas no leguminosas que efectúan la fijación simbiótica de nitrógeno.

Las bacterias más importantes desde el punto de vista agrícola y económico son las bacterias rizobiáceas (familia *Rhizobiaceae*), las cuales forman nódulos en las raíces de las plantas leguminosas (alfalfa, soya, frijol, cacahuate, chícharo, trébol, etc.). Las rizobiáceas también nodulan plantas no leguminosas como las pertenecientes al género *Parasponia*.

Otros microorganismos simbioses importantes son *Azospirillum* y *Frankia*. Las bacterias del género *Azospirillum* establecen importantes simbiosis con el maíz y con el trigo, que han sido muy estudiadas (Taiz y Seiger, 1998). *Frankia* es un actinomiceto que forma nódulos en plantas no leguminosas como el aliso (*Alnus*), el laurel (*Myrica*), el pino australiano (*Casuarina*), miembros de la familia *Rosaceae*, y ciertos arbustos (*Ceanothus*) (Hopkins, 1995). Tanto *Frankia* como las bacterias rizobiáceas viven libremente en el suelo, pero fijan nitrógeno sólo en simbiosis con el hospedero apropiado.

Existen numerosas razones de peso para estudiar la FSN. La primera es su indudable importancia agronómica y ecológica, ya que cualquier esperanza de mejorar la fijación de nitrógeno depende de la capacidad de controlar genéticamente el proceso. La segunda razón es la posibilidad de descubrir como la FSN puede adaptarse a contextos metabólicos altamente especializados, que dependen de las condiciones del medio ambiente en que se encuentran las plantas. Esta adaptación ha resultado en la adopción de mecanismos originales y muy sensibles, como el reconocimiento específico de señales entre la planta hospedera y el microorganismo simbiote que permite la formación de nódulos y bacteroides en las plantas leguminosas (Kaminsky *et al.*, 1998; Oláh *et al.*, 2001).

La fijación de nitrógeno en los organismos simbioses es semejante a la fijación que realizan los organismos de vida libre, aunque en el caso de las bacterias rizobiáceas, el microorganismo fijador existe como un bacteroide dentro de las células de la raíz. Los bacteroides consisten de una o más bacterias rodeadas por una envoltura denominada membrana peribacteroidal. Dentro de esta membrana, los bacteroides están protegidos por varias capas que controlan la difusión del oxígeno, y dicho gas es transportado mediante

la leghemoglobina, una clase de hemoglobina que sólo se encuentra en las leguminosas. Para auxiliar al bacteroide, la planta segrega varios productos llamados nodulinas. Es interesante notar que los bacteroides son similares en muchos aspectos a la mitocondria; son osmóticamente sensibles y carecen de una pared celular rígida (Hall *et al.*, 1981).

Vance calculó que, si se reemplazara el nitrógeno fijado por las leguminosas con amoníaco obtenido mediante el proceso Haber-Bosch, anualmente se requerirían 288 millones de toneladas de combustibles, con un costo de US\$ 30,000 millones. Esto hace necesaria la búsqueda de otras alternativas, como una fijación biológica mejorada que permita el desarrollo de la agricultura sustentable. Además, el nitrógeno fijado biológicamente es menos susceptible a transformaciones químicas que conduzcan a su volatilización y filtración (Vance, 1998).

4.3. Las leguminosas y su importancia biológica y económica

La familia de las leguminosas, *Leguminosae* o *Papilionoideae*, está dividida en las subfamilias *Mimosaceae*, *Caesalpiniaceae* y *Fabaceae*, con 674 géneros y 19,000 especies. Las leguminosas son las plantas de mayor importancia económica después de las gramíneas (familia *Poaceae*) (van Berkum y Eardly, 1998). Las leguminosas aportan de 25 a 35% de la proteína mundial (Vance, 1998), y sus bacterias invasoras, las rizobiáceas, fijan 90 MTg de N (Graham y Vance, 2000), que constituye el 75% de la FSN, el 60% de la FBN y más de la tercera parte del nitrógeno total fijado anualmente.

La simbiosis que se establece entre estas plantas y las bacterias rizobiáceas, tiene un enorme significado económico y ecológico al permitir la recuperación del suelo para realizar nuevos cultivos (van Berkum y Eardly, 1998). La rotación de cultivos es practicada desde tiempos inmemoriales en todo el mundo; ya Teofrasto (*ca.* 370-285 a.C.), el sucesor de Aristóteles al frente del Liceo, escribió acerca del empleo de estas plantas para revigorizar los suelos de Macedonia y Tesalia (Graham, 1998). Tras las publicaciones iniciales sobre el género *Rhizobium*, entre 1886 y 1888 por Hellriegel y Wilfarth, comenzó la inoculación de cultivos con estas bacterias por Nobbe y Hiltner, en 1896. El método tradicional de inoculación fue desarrollado en 1915 por Stevens (Maier y Triplett, 1996).

Las plantas leguminosas adquieren cada vez una mayor importancia, debido a la explosión demográfica que vivimos, con el aumento consecuente en la demanda de alimentos.

Las plantas proporcionan a la población el 80% de sus requerimientos calóricos y proteicos (Gardner *et al.*, 1998). Plantas de gran importancia, como el maíz, dependen por completo de los nutrientes fijados biológicamente, o proporcionados por medios artificiales.

Además de aumentar la fertilidad de los suelos, las leguminosas ayudan a combatir pestes y enfermedades; por ejemplo, la alfalfa está relacionada con la producción de anticuerpos en el tabaco. La biomasa de las leguminosas podría utilizarse para generar electricidad, y producir compuestos necesarios para la industria, como amilasas y peroxidasas. El uso de estas plantas para procesos industriales y farmacéuticos podría reducir substancialmente los costos de producción, ya que el carbono y nitrógeno requeridos para las síntesis derivarían de un sistema sustentable y renovable (Vance, 1998).

Las leguminosas tienen un gran potencial en la fitorremediación de suelos al degradar compuestos xenobióticos tales como tricloroetileno, aldrin®, carbamatos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, compuestos fenólicos, etc. (Vance, 1998). En México existen estudios de fitorremediación de suelos contaminados con cadmio y plomo, utilizando trébol blanco (*Trifolium repens*) y alfalfa (*Medicago sativa*) (Salgado *et al.*, 2003; Castañeda *et al.*, 2003).

La leguminosa que infecta nuestra bacteria de estudio, el frijol (*Phaseolus vulgaris*), reviste especial importancia en América Latina. A nivel alimenticio, el frijol es la principal fuente de proteínas del pueblo de México, y en los sistemas tradicionales de agricultura está asociado al maíz, otro alimento básico (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero., 2001).

4.4. Las bacterias rizobiáceas

Los *rhizobia*, o bacterias rizobiáceas, son microorganismos con características taxonómicas diferentes, agrupados dentro de la familia *Rhizobiaceae*. Estos microorganismos pertenecen a la clase 2 de las α -proteobacterias. Son bacilos Gram negativos, de metabolismo aeróbico, que se movilizan mediante flagelos.

La familia *Rhizobiaceae* comprende principalmente los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. También contiene otros géneros, como *Rhodospirillum* y *Agrobacterium*. Algunas especies se clasifican en variedades biológicas (biovars), de acuerdo al hospedero que invaden. En la tabla 5 se presentan algunas bacterias de la familia con sus organismos hospederos.

Tabla 5. Ejemplos de bacterias rizobiáceas que establecen simbiosis con plantas.

Fuentes: Glick y Pasternak, 1998; Graham, 1998; Taiz y Zeiger, 1998; Madigan *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001

Bacteria	Planta
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i> (soya)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> (loto)
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)
<i>Rhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega officinalis</i>
	<i>Galega orientalis</i>
<i>Rhizobium huakii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> (astrágalo)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>lathyrus</i>	<i>Lathyrus sativum</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Vicia sativa</i> (chícharo)
<i>Rhizobium lupini</i>	<i>Lupinus</i>
	<i>Ornithopus</i>
<i>Rhizobium trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (trébol)
	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus</i>
	<i>Leucaena</i>
	<i>Macroptilium</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)
	<i>Melilotus</i> (trébol)
	<i>Trigonella</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	<i>Acacia</i>

Las bacterias rizobiáceas son muy eficientes en la FSN. Se calcula que una hectárea de rizobiáceas fija entre 25 y 60 kg de N₂, en comparación con una hectárea de organismos no simbióticos que fija menos de 5 kg (Vance, 1998). El rendimiento varía en función del organismo hospedero y del microorganismo simbiote: Se sabe que una hectárea de trébol puede fijar hasta 600 kg N/Ha, mientras que otras leguminosas fijan de 100 a 200 kg N/Ha, aportando entre el 40 y el 85% de los requerimientos de este elemento a las plantas (Graham, 1998).

5. Fisiología y bioquímica de la fijación simbiótica de nitrógeno

La fijación de nitrógeno en las leguminosas involucra interacciones anatómicas, morfológicas y bioquímicas muy complejas entre el hospedero y los microorganismos invasores. Como parte de su ciclo de vida, las bacterias rizobiáceas invaden las células de la raíz plantar, iniciando una serie compleja de cambios que conducen a la formación de nódulos radiculares. Dentro del nódulo, la bacteria prolifera y persiste en una forma que carece de pared celular, denominada bacteroide, cuyo complejo enzimático nitrogenasa lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Glick y Pasternak, 1998).

5.1. Proceso de infección, nodulación y formación del bacteroide

El proceso de nodulación puede describirse como sigue (Brewin, 1991):

- 1) Las raíces de la planta liberan compuestos flavonoides que atraen a las bacterias invasoras por quimiotaxis, y liberan otras sustancias que estimulan su crecimiento (aminoácidos como serina). Las rizobiáceas se adhieren a las células epidérmicas de los pelos radiculares, colonizando toda la raíz.
- 2) Las bacterias liberan compuestos que son reconocidos por la planta, inhibiendo la respuesta defensiva y permitiendo la invasión de las rizobiáceas. También intervienen otras sustancias como los compuestos tipo Nod (que provocan el enrollamiento de la raíz) o enzimas que degradan la pared celular de la planta (como celulasa, lignasa y 1,4- β -glucanasa).
- 3) Las bacterias penetran a través del pelo radicular hacia la corteza interna de la raíz, formando un filamento infeccioso. El filamento es visible al cabo de 3 días.
- 4) Las células de la corteza se deforman y comienzan a dividirse formando estructuras conocidas como nódulos, visibles en un período de 5 a 12 días.
- 5) Las bacterias sintetizan polisacáridos externos, como heteropolisacáridos, β -glucanos neutros y lipopolisacáridos. Estos polisacáridos protegen a la bacteria de sustancias osmóticas y pueden interactuar con moléculas de la planta, como lectinas y adhesinas.
- 6) Luego de atravesar cierto número de células vegetales, las bacterias que formaban el filamento infeccioso son endocitadas por las células del nódulo. Una vez endocitadas, las bacterias se transforman en bacteroides. Tanto la bacteria como la planta huésped

- sufren una serie de cambios para llevar a cabo la diferenciación de los bacteroides y la fijación simbiótica de nitrógeno.
- 7) El nódulo engloba a las bacterias con una membrana de características antigénicas similares a las células vegetales (membrana peribacteroidal). Dentro de la membrana peribacteroidal las células infectadas dejan de dividirse, pero las células a su alrededor se vuelven meristemáticas, por lo que el nódulo continúa creciendo. Las capas externas del nódulo, que no están infectadas, forman una corteza cuyos elementos vasculares conectan el nódulo al resto del sistema vascular de la planta.
 - 8) Los bacteroides fijan nitrógeno gracias a la activación de los genes estructurales y reguladores de la nitrogenasa. Ocurren otros cambios simultáneos en el metabolismo, como la expresión de citocromos con alta afinidad hacia el oxígeno, que no se expresan cuando la bacteria está en vida libre. La fijación de nitrógeno es evidente después de 15 días de la inoculación.
 - 9) La planta sintetiza sustancias llamadas nodulinas que son necesarias para la formación, desarrollo y mantenimiento de los nódulos y bacteroides. Una de las principales nodulinas es la leghemoglobina, una hemoproteína capaz de captar oxígeno con gran rapidez para liberarlo gradualmente en el interior del bacteroide, de modo que la concentración de oxígeno en la membrana peribacteroidal es de 3 a 30 nM, una concentración 10^4 o 10^5 veces menor a la concentración fuera del bacteroide (250 μ M). El grupo hemo de la leghemoglobina es producido por la bacteria, mientras que la globina es producida por la planta.

5.2. Bioquímica de la fijación simbiótica de nitrógeno

En casi todos los organismos fijadores de nitrógeno, esta reacción es catalizada por un complejo enzimático llamado dinitrogenasa, o simplemente nitrogenasa. Este complejo está compuesto de dos proteínas fácilmente separables que varían en su tamaño, denominadas proteína Fe y proteína MoFe (Kaminsky *et al.*, 1998).

La proteína más pequeña, conocida como proteína Fe, componente II o nitrogenasa reductasa, es un homodímero de aproximadamente 60 kD, formado por dos subunidades con masa molecular entre 24 y 36 kD, codificadas por el gene *nifH*. El dímero contiene un cluster

único de 4 átomos de hierro enlazados a 4 grupos azufre, el cual está enlazado entre las subunidades del componente II. La proteína Fe tiene dos sitios de enlace a Mg-ATP. Al adherirse el ATP a esos sitios, el potencial de los electrones en el cluster Fe_4S_4 disminuye, permitiendo a la proteína Fe donar electrones a la proteína MoFe (Vance, 1998).

La proteína más grande es llamada proteína MoFe, componente I o nitrogenasa. Es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ con una masa molecular aproximada de 220 kD. Las subunidades α y β tienen masas moleculares de 56 y 60 kD respectivamente, y los genes que codifican su transcripción son *nifD* y *nifK*. Cada proteína MoFe contiene dos clusters $MoFe_6S_8$ y de dos a cuatro clusters Fe_4S_4 . El papel de la proteína MoFe es transferir electrones al N_2 y los H^+ (Vance, 1998). Los dos clusters $MoFe_6S_8$ conforman el cofactor MoFe, que es el sitio catalítico donde se lleva a cabo la reducción de N_2 a NH_3 (Kaminsky *et al.*, 1998). El número de clusters Fe_4S_4 varía de acuerdo a la especie o condición fisiológica (Hopkins, 1995). Se sabe de la existencia de dinitrogenasas alternas, en especies como *Azotobacter*, que presentan vanadio en vez de molibdeno (Burris, 1991).

La reducción se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso, la proteína Fe es reducida por un donador primario de electrones. En el segundo paso, la proteína Fe reducida dona sus electrones a la proteína FeMo, la cual cataliza la reducción del nitrógeno y del hidrógeno. Los donadores primarios de electrones varían según la fisiología del organismo (Kaminsky *et al.*, 1998), y generalmente son ferredoxinas (Hopkins, 1995) o flavodoxinas (Miranda, 1995). Los electrones son transferidos uno por uno a la proteína MoFe en un proceso que involucra hidrólisis de ATP, el cual reacciona con la proteína reducida Fe y facilita la transferencia de electrones entre las proteínas Fe y MoFe (Hopkins, 1995). Este ciclo se repite hasta que se ha reducido por completo el sustrato (Kaminsky *et al.*, 1998). El NADH (o NADPH) sirve como fuente de electrones para la reducción de nitrógeno (McKee y McKee, 1996).

La reducción de nitrógeno es muy costosa en términos energéticos. Involucra cerca de 30 moléculas de ATP por cada molécula de N_2 fijada, en comparación con 3 moléculas de ATP necesarias para fijar una molécula de CO_2 por fotosíntesis (Burris, 1991). La necesidad de ATP y agentes reductores determinan una estrecha relación entre la fijación de nitrógeno y otros procesos metabólicos, como la respiración bacteriana y la fotosíntesis. En el caso de las rizobiáceas, la fuente principal de energía son los carbohidratos producidos

fotosintéticamente por la planta, que son oxidados a ácidos dicarboxílicos en el bacteroide, produciéndose el ATP y los agentes reductores necesarios para la fijación de nitrógeno. Cada kg de N fijado por simbiosis en las leguminosas requiere la energía proveniente de entre 6 y 12 kg de carbono fijado fotosintéticamente, y se estima que la fijación de nitrógeno puede consumir de 10 a 20% del carbono total fijado (Vance, 1998; Jensen y Hauggaard-Nielsen, 2003).

En la figura 1 se muestra la actividad del complejo nitrogenasa y su relación con la planta.

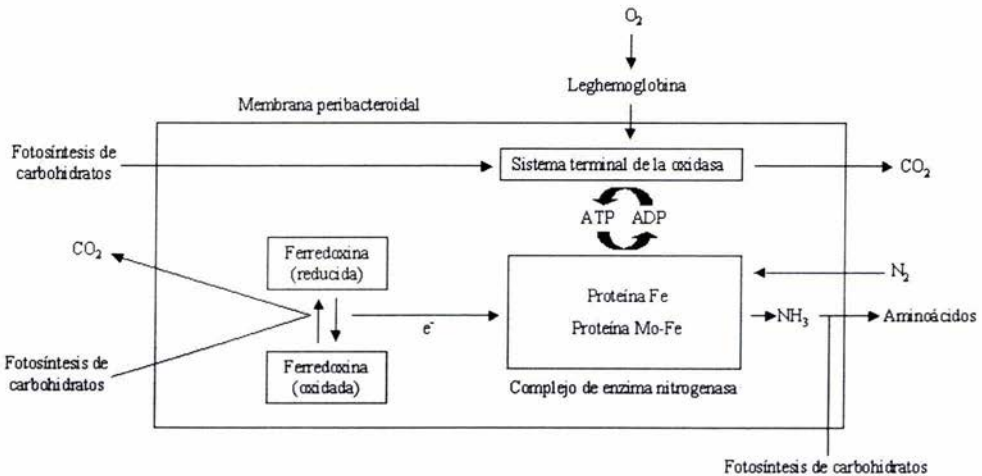


Figura 1. Esquema de la actividad de la nitrogenasa en el bacteroide.

Los carbohidratos suministran la capacidad reductora (ferredoxina), energía (ATP) y precursores orgánicos para la biosíntesis de aminoácidos.

[Tomada de Huheey *et al.*, 1997]

5.3. Paradoja del oxígeno y estrategias para regular los niveles de oxígeno

Tanto la proteína Fe como la proteína MoFe son inactivadas rápida e irreversiblemente por el oxígeno. Los donadores de electrones a la nitrogenasa (tales como la flavodoxina, la ferredoxina y la hidrogenasa) también pueden ser afectados por el oxígeno. Esto crea un problema, ya que la alta cantidad de energía requerida se produce mediante respiración celular y fosforilación oxidativa, procesos que necesitan oxígeno para operar eficientemente (Miranda, 1995). ¿Cómo se resuelve esta paradoja de conciliar la demanda de oxígeno y la sensibilidad del complejo nitrogenasa a dicho gas?

Los microorganismos diazótrofos han desarrollado diversas estrategias para controlar los niveles de oxígeno.

Varios fijadores de vida libre conservan una vida anaerobia. Otros anaerobios facultativos fijan nitrógeno sólo bajo condiciones anaeróbicas, como *Klebsiella pneumoniae*. Con el fin de adaptarse a las condiciones ambientales, los diazótrofos de vida libre tienen una baja producción de energía, por lo que contribuyen muy poco a la FBN (Hopkins, 1995).

Otros organismos forman estructuras especiales para aislar el aparato fijador de nitrógeno. Como ejemplos están el actinomiceto *Frankia*, que forma vesículas, y las cianobacterias, que forman heterocistos (Miranda, 1995). Los heterocistos son células especializadas con paredes de muchas capas delgadas que restringen la difusión del oxígeno, manteniendo bajas concentraciones de este gas (Hopkins, 1995). Las vesículas de *Frankia* muestran una similitud morfológica y funcional con los heterocistos de las cianobacterias, y son capaces de fijar nitrógeno en condiciones aeróbicas, a diferencia de los bacteroides, que sólo pueden hacerlo en condiciones microaeróbicas (Miranda, 1995).

En la tabla 6 se resumen las principales estrategias adoptadas por diversos organismos, para evitar la inactivación de la nitrogenasa por el oxígeno ambiental.

Tabla 6. Estrategias adoptadas por varios diazótrofos para protegerse del oxígeno.

Fuentes: Miranda, 1995; Zuberer, 1998

Estrategia	Ejemplos
Evasión	<i>Clostridium, Desulphovibrio, Clorobium, Chromatium, Rhodobacter capsulatus</i>
Aerotaxis negativa	<i>Azospirillum brasilensi</i>
Agregación	<i>Azospirillum, Azotobacter, Derrxia gumosa, Klebsiella pneumoniae</i>
Asociación con otros organismos	Cianobacterias y bacterias heterótrofas
Protección conformacional	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Heterocistos	Cianobacterias
Vesículas	<i>Frankia</i>
Bacteroides	Bacterias rizobiáceas

5.4. Control del oxígeno en los bacteroides simbióticos

Debido al consumo elevado de ATP y a que la nitrogenasa se inactiva por la presencia de concentraciones aeróbicas de oxígeno, la bacteria controla transcripcionalmente la expresión de la nitrogenasa en función de la tensión parcial de oxígeno (Hennecke, 1993). Esto significa que la bacteria debe encontrarse en un ambiente microaeróbico, como ocurre en el interior del bacteroide, donde la membrana peribacteroidal y la leghemoglobina se encargan de mantener el oxígeno a niveles extremadamente microaeróbicos (Brewin, 1991).

La leghemoglobina es una proteína citosólica que sirve como transportador de oxígeno para mantener la respiración de los bacteroides. Esta proteína, similar en su estructura a la hemoglobina, atrapa el gas antes de que interactúe con el complejo nitrogenasa, controlando su liberación en la región bacteroidal (McKee y McKee, 1996). La leghemoglobina puede constituir hasta 35% de la proteína celular hospedera, impartiendo a los nódulos un peculiar color rosáceo cuando la superficie de la raíz es expuesta al aire (Vance, 1998). La concentración de oxígeno se mantiene a un nivel suficiente para permitir la respiración del bacteroide (5-30 nM) sin inactivar la nitrogenasa (Hopkins, 1995). Los niveles de oxígeno deben ser cuidadosamente balanceados, porque una concentración de oxígeno muy baja también puede limitar la disponibilidad de ATP y, en consecuencia, la actividad de la nitrogenasa en los nódulos (Layzell *et al.*, 1993).

Así, está bien establecido que la baja concentración de oxígeno dentro de los nódulos infectados es mantenida por tres factores: una barrera de difusión de oxígeno, la respiración del bacteroide, y la capacidad amortiguadora de la leghemoglobina (Kaminsky *et al.*, 1998).

6. Metabolismo aeróbico

Los carbohidratos son los principales combustibles para la vida, y el mecanismo más importante para extraer energía a partir de dichas moléculas está constituido por las reacciones de la respiración aeróbica, donde se emplea oxígeno para generar la energía en forma de ATP. Aún las especies fotosintéticas que producen sus propios azúcares deben procesarlos para obtener la energía y los metabolitos necesarios para realizar todas sus actividades. La respiración aeróbica es imprescindible para la vida de los animales superiores y las plantas (Avers, 1991).

Los procesos de respiración anaeróbica (fermentaciones) generan poca energía. Durante la evolución de la atmósfera y de los organismos, se desarrolló la respiración aeróbica con la finalidad de generar una mayor cantidad de energía que permitiera a las células desempeñar más funciones. El proceso de glucólisis permite obtener 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada, mientras que mediante la oxidación aeróbica de la glucosa se obtienen 30 moléculas adicionales de ATP.

El metabolismo aeróbico inicia cuando moléculas con un bajo potencial redox (como el NADH o el FADH₂) donan sus electrones a otros sustratos. Los electrones fluyen a través de una serie de cofactores (varios de ellos citocromos), desembocando en la reducción del oxígeno, una molécula con un alto potencial redox. Esta transferencia de electrones es llamada **cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones (CTE)**. El flujo de electrones se realiza desde las moléculas con el potencial más negativo (NAD⁺/NADH) hasta las moléculas con el potencial más positivo (O₂/H₂O). El cambio en el potencial redox de este sistema está relacionado con un cambio en la energía libre, que puede ser aprovechado por la célula para efectuar otras funciones metabólicas.

La célula necesita convertir el cambio en energía libre del sistema (ΔG) en una forma de energía que pueda almacenar y aprovechar fácilmente: ATP, el cual se produce mediante fosforilación oxidativa, un proceso bioquímico íntimamente relacionado con la cadena respiratoria. Actualmente se acepta como modelo para la síntesis de ATP el modelo de acoplamiento quimiosmótico de Mitchell, el cual propone que la energía proveniente del transporte de electrones se utiliza en un transporte activo de protones de la matriz mitocondrial, es decir, la CTE propicia una translocación de protones (H⁺) a través de la membrana mitocondrial (o a través de la membrana periplásmica en procariontes), originando un gradiente electroquímico de protones (a este gradiente también se le llama fuerza protonmotriz). La energía derivada de este transporte de protones se utiliza en la síntesis de ATP (Richardson, 2000; Vázquez, 2002).

La oxidación de los sustratos orgánicos se resume en tres etapas. En la primera etapa, se genera Acetil-CoA a partir de piruvato. En la segunda etapa, el Acetil-CoA es oxidado mediante el ciclo de Krebs, generando NADH, FADH₂, CO₂ y ATP. En la tercera etapa, los acarreadores de electrones que fueron reducidos en el ciclo de Krebs, se reoxidan mediante la cadena

respiratoria y la fosforilación oxidativa, generando más ATP, CO₂, H₂O, FADH₂ y NADH. Con las últimas dos moléculas puede reiniciarse el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria.

6.1. Ciclo de Krebs

En las bacterias aeróbicas, el ciclo de Krebs (también llamado ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbónicos) genera nucleótidos reducidos (NADH, FADH₂) por medio de la oxidación completa de Acetil-CoA a CO₂. El Acetil-CoA se forma a partir de piruvato, proveniente a su vez de otros procesos de oxidación, como la glucólisis y la β-oxidación de ácidos grasos. El ciclo de Krebs genera energía en forma de ATP al actuar en conjunción con la fosforilación oxidativa. Además de la generación de energía, el ciclo del ácido cítrico también constituye el punto de inicio de diversos ciclos anabólicos como la gluconeogénesis, la síntesis de aminoácidos y la síntesis de porfirinas, al producir los intermediarios necesarios para estos procesos (McKee y McKee, 1996).

6.2. Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

Las coenzimas producidas durante la glucólisis, la β-oxidación de ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico (NADH, FADH₂, FMNH₂), se utilizarán para generar más energía por medio de una transferencia de electrones a través de varias proteínas que funcionan como transportadores redox, los cuales reciben y donan electrones para transferirlos, en el último paso de la cadena, al oxígeno molecular, reduciéndolo a agua, y permitiendo la síntesis de ATP:



Los componentes principales de las proteínas redox implicadas en la cadena respiratoria son: la flavina mononucleótido (FMN), las quinonas (coenzima Q), y el grupo hemo de los citocromos (Avers, 1991). La síntesis de ATP se efectúa mediante fosforilación oxidativa. Por este proceso los organismos aeróbicos obtienen hasta el 95% de su energía (Mitchell, 1979).

Es importante señalar que la reducción de O₂ a H₂O es una reacción exergónica que necesita ser catalizada. Las oxidasas terminales que llevan a cabo esta reacción generalmente son miembros de la superfamilia de oxidasas hemocúpricas (HCO), las cuales están presentes en todos los organismos, tanto procariontes como eucariontes (para una revisión de las oxidasas hemocúpricas, consúltese García-Horsman *et al.*, 1994a).

Además de la generación de energía, la respiración puede tener otras finalidades como eliminar agentes reductores. Esta última función puede ser muy importante en condiciones de crecimiento donde las células utilizan otras fuentes de energía (como la glucólisis o la fotosíntesis). Dependiendo de las condiciones de crecimiento, la célula debe balancear sus necesidades para lograr la cadena respiratoria óptima que cumpla las siguientes funciones de manera adecuada (García-Horsman *et al.*, 1994a):

- a) Máxima proporción H^+/e^- (eficiencia de la síntesis de ATP)
- b) Eliminación rápida de compuestos no deseados, como oxígeno y agentes reductores (caso de los bacteroides)

6.3. Cadena respiratoria en eucariontes

En los eucariontes, la respiración se desarrolla en las mitocondrias, que poseen una cadena respiratoria única. La oxidasa terminal es la citocromo c oxidasa aa_3 , una enzima muy eficiente, capaz de reducir más de cien moléculas de oxígeno a agua cada segundo (Verhovsky *et al.*, 1994). La cadena respiratoria mitocondrial se resume como sigue:



6.4. Cadenas respiratorias en bacterias

En contraste a la cadena única de las mitocondrias, las bacterias presentan cadenas respiratorias ramificadas. Los citocromos se agrupan en oxidasas terminales de diferente composición y afinidad hacia el oxígeno. Estas oxidasas terminales forman cadenas respiratorias específicas para cada bacteria (Anraku, 1988). Las cadenas respiratorias alternas permiten a las bacterias utilizar un amplio rango de concentraciones de oxígeno, lo que les ayuda a vivir en medios donde la concentración de oxígeno cambia drástica o frecuentemente (Miranda, 1995).

Esta diversidad en sus cadenas depende de varios factores, como el potencial redox de los elementos donadores y receptores de electrones, las interacciones entre el sistema respiratorio y otros intercambiadores de electrones, la información genética del organismo y su capacidad para regular la síntesis de componentes redox de acuerdo a las necesidades de la célula, bajo diferentes condiciones de cultivo (Harold, 1986).

Además, muchas bacterias no sólo utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones, sino que también poseen oxidasas y cadenas específicas que emplean otros sustratos como óxidos de azufre, nitrógeno, arsénico y selenio; metales de transición como hierro y manganeso; radionúcleos como uranio y tecnecio. Existe una competencia entre las cadenas respiratorias, pero cada una se desarrolla bajo diferentes condiciones, lo cual confiere a los microorganismos una gran adaptabilidad, pudiendo vivir en prácticamente todos los ambientes terrestres: en el suelo, en el aire, en el agua, dentro de otros organismos, en ambientes microaeróbicos como los bacteroides, en ambientes anaeróbicos, e incluso en volcanes y sitios radiactivos (Richardson, 2002).

Las oxidasas terminales presentes en las bacterias (HCO) son proteínas membranosas que emplean la energía liberada durante el transporte de electrones para generar un gradiente de protones a través de la membrana periplásmica (García-Horsman *et al.*, 1994a). Se cree que todos los miembros de esta superfamilia tienen un origen monofilético, ya que contienen una subunidad catalítica altamente conservada (subunidad I). En esta subunidad se encuentra el sitio de unión a la membrana, donde existe un hemo hexacoordinado de bajo espín, el cual transfiere los electrones hacia el sitio activo. El sitio activo contiene un centro bimetalico formado por el hierro de un hemo pentacoordinado de alto espín (Fe_{A3}) y un ion cobre adyacente (Cu_B); es el lugar donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno a agua (Babcock y Wikström, 1992).

Las oxidasas hemocúpricas pueden dividirse en dos grupos principales: las quinol oxidasas, como el citocromo bo_3 de *Escherichia coli*, y las citocromo c oxidasas, como el citocromo aa_3 de *Rhodobacter sphaeroides*. Es importante señalar esta división, dado que las cadenas respiratorias en bacterias se ramifican a partir de dos puntos: de la poza de quinol y del complejo citocromo c, canalizándose el transporte electrónico hacia quinol oxidasas o hacia citocromo c oxidasas, respectivamente. La principal diferencia entre las quinol oxidasas y las citocromo c oxidasas es la presencia de un cuarto centro metálico llamado cobre púrpura (Cu_A) en la subunidad II de las citocromo c oxidasas, el cual es el sitio de entrada para los electrones derivados del citocromo c reducido, junto con un centro inactivo redox Mn^{2+} o Mg^{2+} entre las subunidades I y II (García-Horsman *et al.*, 1994b).

Existe una infinidad de cadenas respiratorias divergentes en las bacterias. Las cadenas aeróbicas principales se resumen en la figura 2.

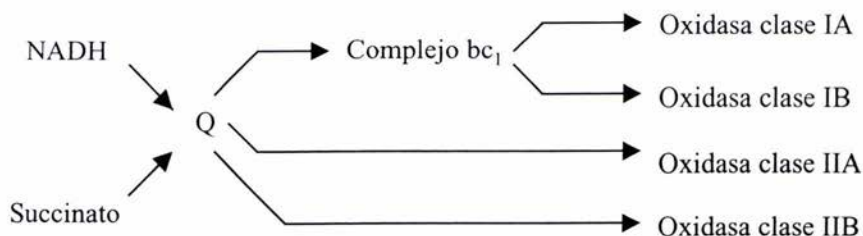


Figura 2. Cadenas respiratorias aeróbicas en bacterias.

Se muestran las oxidasas terminales de clase IA (aa_3 , caa_3), clase IB (b , cb , cbb_3), clase IIA (bo) y clase IIB (bd). Las oxidasas clase I son citocromo c oxidasas, y las oxidasas clase II son quinol oxidasas. La oxidasa clase IA es la contraparte del complejo mitocondrial IV, pero las otras tres oxidasas sólo se encuentran en bacterias. Las bacterias poseen más de una oxidasa terminal para poder adaptarse a cambios ambientales de oxígeno. La respiración realizada por las citocromo c oxidasas genera más energía que la efectuada por las quinol oxidasas, pero en ciertas condiciones, la bacteria opta por utilizar las quinol oxidasas.

[Modificada de Anraku, 1988]

6.5. Cadenas respiratorias en bacterias rizobiáceas

Estas bacterias son capaces de crecer bajo condiciones muy diversas, expresando distintas cadenas respiratorias. *Rhizobium etli* puede crecer aeróbicamente, microaeróbicamente con 2% de oxígeno, y quimiolitotróficamente con H_2 y CO_2 (Membrillo, 1991).

Las bacterias rizobiáceas presentan cadenas respiratorias ramificadas, que terminan en oxidasas con diferentes afinidades por el oxígeno. Esto permite a la célula adaptar su sistema respiratorio para satisfacer las demandas de la concentración de oxígeno, frecuentemente cambiante. Mientras que la concentración de oxígeno en el aire saturado es alrededor de $250 \mu M$ (condiciones aeróbicas normales), en los nódulos es extremadamente baja, de 3 a $30 nM$ (Hennecke, 1993). Bajo estas condiciones microaeróbicas, los bacteroides dependen del ATP producido por la respiración para satisfacer su metabolismo y la fijación de nitrógeno. Los bacteroides desarrollan una cadena respiratoria específica que garantiza a la célula la mejor utilización de las concentraciones extremadamente bajas de oxígeno en el medio ambiente.

Debe aclararse que no todas las cadenas respiratorias que catalizan las mismas reacciones tienen el mismo tipo de componentes redox. Dependiendo de las condiciones de crecimiento, ocurren diferencias importantes entre especies y aún en una misma especie (Barquera, 1990).

Las primeras investigaciones sobre la naturaleza de las cadenas respiratorias fueron de carácter bioquímico, empleando técnicas espectroscópicas diferenciales; posteriormente hubo muchos estudios de carácter genético, identificando los genes responsables de la expresión de citocromos por medio del aislamiento y caracterización de diversas cepas mutantes en distintas especies rizobiales (*cfr.* Delgado *et al.*, 1998). En las últimas dos décadas se han logrado numerosos avances para descifrar la naturaleza de las cadenas respiratorias.

A continuación se presentan las cadenas respiratorias de la rizobiácea más estudiada, *Bradyrhizobium japonicum* (figura 3), y de nuestra bacteria de estudio, *Rhizobium etli* (figura 4).

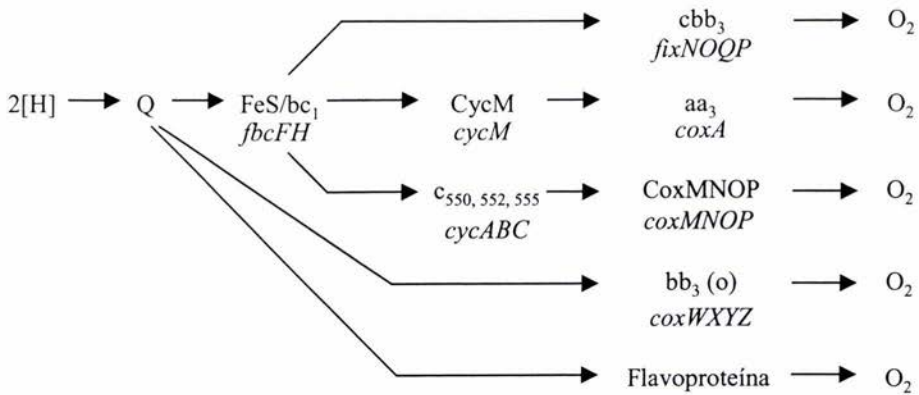


Figura 3. Cadena respiratoria de *Bradyrhizobium japonicum*.

Las oxidasas terminales *cbb*₃, *aa*₃ y *CoxMNOP* son citocromo c oxidasas, mientras que la flavoproteína putativa y la oxidasa *bb*₃ son quinol oxidasas.

- La citocromo c oxidasa *cbb*₃ (*fixNOQP*) es esencial para la simbiosis, y realiza más del 80% de la respiración en el bacteroide. Su alta afinidad por el oxígeno [$K_m = 7$ nM] es menor a la constante de disociación de la oxileghemoglobina LbO_2 [$K_d = 43.5$ nM] (Preisig *et al.*, 1996a). Esta oxidasa funciona como una bomba de protones (Arslan *et al.*, 2000).
- La citocromo c oxidasa *aa*₃ es la oxidasa principal en el estado libre de la bacteria y en cultivos aeróbicos. Tiene baja afinidad por el oxígeno [$K_m = 4$ a 8 μ M] (Poole, 1983). También actúa como una bomba de protones (Poole, 1988).
- La citocromo c oxidasa *CoxMNOP* es una oxidasa terminal alterna cuya función no se conoce bien (Bott *et al.*, 1992).
- La citocromo quinol oxidasa *bb*₃ (*coxWXYZ*) fue confundida inicialmente con un citocromo tipo o (Surpin *et al.*, 1994; Surpin *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 1998), por lo que suele aparecer en la literatura como citocromo oxidasa tipo o. También se nombra citocromo oxidasa *bb'*/*bo*/*bo'* en otras especies (Azarkina *et al.*, 1999). Se ha propuesto que esta oxidasa es importante para la simbiosis, funcionando a niveles micromolares de oxígeno durante el proceso de infección y el estado inicial del bacteroide maduro, mientras que la oxidasa *cbb*₃ funciona a niveles nanomolares de oxígeno del bacteroide maduro (Surpin y Maier, 1999). La quinol oxidasa *bb*₃ efectúa la respiración en cepas mutantes del complejo *bc*₁ (Bott *et al.*, 1990). Su afinidad por el oxígeno: [$K_m = 1.8$ a 6.5 μ M] (Poole, 1983).
- Se ha sugerido la existencia de una flavoproteína poco usual como quinol oxidasa. No se sabe casi nada sobre ella en *Bradyrhizobium japonicum*. Probablemente se trate de un mecanismo eliminador de oxígeno (Hennecke, 1993).

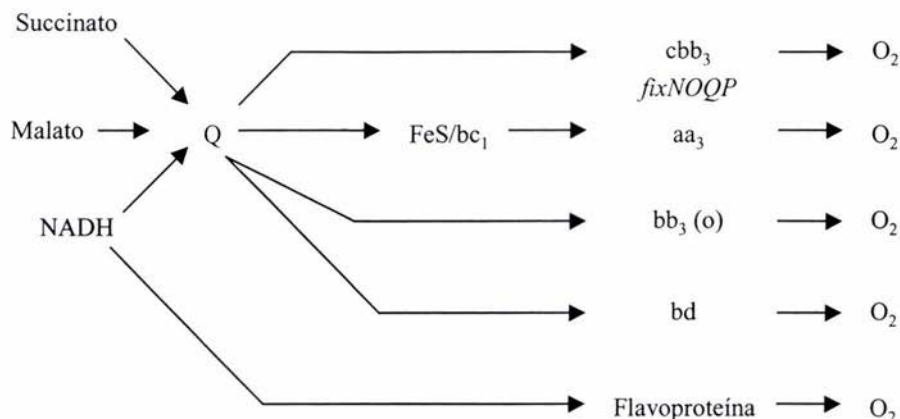


Figura 4. Cadena respiratoria de *Rhizobium etli*.

- La citocromo c oxidasa terminal *cbb₃* es esencial para la simbiosis, siendo similar a la oxidasa *cbb₃* de *B. japonicum* (Soberón *et al.*, 1989 y 1990; Miranda *et al.*, 1996).
- La citocromo c oxidasa terminal *aa₃* predomina en la vida libre y en aerobiosis; sin embargo, se ha observado su expresión reprimida en condiciones microaeróbicas e incluso durante la simbiosis, como es el caso de la cepa CFN030 (Miranda *et al.*, 1996). Probablemente contribuya a la respiración en los nódulos jóvenes, junto con las quinol oxidasas *bb₃* y *bd* (Soberón *et al.*, 1989 y 1990; Mandon *et al.*, 1994).
- La quinol oxidasa *bb₃* también ha sido denominada erróneamente citocromo tipo o (Delgado *et al.*, 1998). Hay estudios que sugieren una relación existente entre esta oxidasa y el fenotipo simbiótico de *Rhizobium etli* (Ramírez *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002).
- La expresión del citocromo *bd* (citocromo tipo d) bajo condiciones restringidas de oxígeno, así como cuando se ha reprimido la expresión de los citocromos *aa₃* y *bb₃*, hacen pensar que es el recurso de la bacteria para vivir en condiciones muy duras, aún en presencia de cianuro (Barquera *et al.*, 1991a). Se conocen citocromos de este tipo en *E. coli* muy resistentes a los iones cianuro y azida, que también se expresan en condiciones limitadas de cobre (Ingledew y Poole, 1984). Este citocromo tiene una afinidad muy alta hacia el oxígeno [$K_m = 0.02$ a $0.39 \mu M$] (Miranda, 1995), y posiblemente esté activo durante la simbiosis (Mandon *et al.*, 1994). En *Azorhizobium caulinodans* (Kitts y Ludwig, 1994) y *Klebsiella pneumoniae* (Comadurán *et al.*, 1998) el citocromo *bd* tiene un papel muy importante en la fijación de nitrógeno. En realidad, el citocromo *bd* es un complejo formado por dos citocromos tipo b (uno de bajo espín y uno de alto espín) y un citocromo tipo d (von Wachenfeldt y Hederstedt, 2002), por lo que también puede confundirse el hemo B de alto espín con un hemo tipo O (oxidasa *bb₃/bo*).
- Se ha encontrado una flavoproteína oxidasa dependiente de NADH en cultivos de *R. etli*, de baja afinidad hacia el NADH y hacia el oxígeno, que no se expresa en los bacteroides [$K_m = 80 \mu M$]. Tal vez esta flavoproteína sirva como oxidasa terminal en el metabolismo de hidrógeno (Barquera *et al.*, 1991b).

6.6. Importancia del estudio de la cadena respiratoria

Los experimentos iniciados por el científico de origen ruso David Keilin (1887-1963) en el Instituto Molteno (Universidad de Cambridge, Inglaterra), son la piedra angular de una gran cantidad de investigaciones que siguen realizándose hoy en día, incluyendo la nuestra.

Los citocromos fueron descubiertos por C. A. MacMunn en 1884 (Anraku, 1988). David Keilin los redescubrió al estudiar el parásito equino *Gastrophilus intestinalis*, dando a conocer el concepto de citocromo en un artículo denominado "On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants" (Keilin, 1925, citado por Anraku, 1988). Fue Keilin quien reconoció que los citocromos estaban compuestos de hemoproteínas, las cuales participaban en la respiración, y las clasificó con base en su espectro de absorción visible como citocromos tipo a, b y c (Horton, 1993). Sus estudios sobre el sistema de citocromos lo condujeron a establecer el primer fundamento del metabolismo aeróbico: el concepto de cadena respiratoria, que fue ampliándose con el tiempo (*cf.* Ferguson, 2001; Slater, 2003).

Edward C. Slater, discípulo de Keilin, propuso formalmente la hipótesis de acoplamiento quimiosmótico a la cadena respiratoria para la generación de ATP (Slater, 1953). Esta hipótesis condujo al firme establecimiento de la teoría quimiosmótica del bioquímico inglés Peter Mitchell, quien introdujo nuevas ideas en el campo de la bioquímica para explicar la fisiología celular (Mitchell, 1961). La teoría quimiosmótica de Mitchell, propuesta originalmente para explicar el mecanismo de la fosforilación oxidativa, se ha extendido a otras funciones celulares, como la fotofosforilación y el transporte activo secundario.

Por la contribución de sus investigaciones a la bioquímica, Peter Mitchell recibió en 1978 el premio Nobel de Fisiología y Medicina. En sus propias palabras, "continúan vigentes los conceptos de Keilin" (Mitchell, 1979).

Las cadenas respiratorias en bacterias -tanto anaerobias como aerobias- han sido objeto de mucho interés debido a su gran versatilidad para adaptarse a ambientes diferentes. Estos sistemas constituyen fuentes genéticas muy ricas para estudiar la evolución bioquímica del metabolismo respiratorio y la biosíntesis de citocromos (Barquera, 1990). Hoy en día se está conociendo la variabilidad de la respiración en los genomas de bacterias patógenas como *Mycobacterium tuberculosis* y *Haemophilus influenzae*, por lo que es necesario estudiar la naturaleza de su adaptación respiratoria para poder entender las condiciones de supervivencia

de estos organismos patógenos. Es importante el conocimiento que se tenga sobre la respiración bacteriana con fines clínicos; existen ejemplos numerosos en la literatura, como la presencia de nitrito reductasas en el suero de pacientes con gonorrea, la existencia de una relación entre el citocromo bd y la virulencia de *Shigella flexneri* (Richardson, 2002), o el hecho de que *Helicobacter pylori* sólo posee la oxidasa terminal cbb₃, la cual parece funcionar como un sensor de las condiciones ambientales (Myllykallio y Liebl, 2000). Todo esto hace necesario estudiar más el fenómeno de la respiración, además de que muchas bacterias con cadenas respiratorias diversificadas pueden servir en biorremediación ambiental.

Así, el estudio de la respiración es fundamental en las ciencias biológicas, pues al conocer mejor los mecanismos que rigen la respiración y las funciones de los citocromos, podremos entender mejor la fisiología de los organismos, la evolución biológica, y procesos relacionados con la respiración como la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno.

7. Regulación genética de la fijación simbiótica de nitrógeno

Las bases moleculares que permiten el establecimiento de una simbiosis entre las rizobiáceas y sus hospederos, forman un sistema realmente complejo. Se han encontrado más de 24 genes *nod* que regulan la formación de los nódulos, los cuales darán origen a los bacteroides, aparte de varios grupos de genes relacionados con otras funciones, como la hidrogenasa (*hup*) o la superficie externa del bacteroide (*exo*, *lps*, *ndv*). Sobre los genes que controlan la formación de los nódulos y nodulinas, así como la participación de proteínas de la planta tales como flavonoides y lectinas, se recomienda la consulta de Atlas y Bartha (1998), Westhoff (1998).

Los genes encargados de la fijación de nitrógeno son los genes *nif* y *fix*, principalmente. Existen tanto genes estructurales (como *nifH* y *nifK*, responsables de las unidades I y II del complejo nitrogenasa) como genes reguladores (*nifA*, el principal regulador de la expresión genética de la fijación de nitrógeno).

La expresión de todos estos genes, a su vez, es bastante compleja, ya que:

- a) Dichos genes tienen relaciones de regulación directas e indirectas.
- b) Se agrupan de diferente manera en cada especie
- c) Hay otros factores por considerar, como la concentración de oxígeno, el cual induce y regula la expresión de los genes *nif*

Se sabe que en la regulación de la expresión del complejo nitrogenasa intervienen un promotor especializado, una ARN polimerasa que contiene un factor σ^{54} , y la proteína activadora NifA (Kaminsky *et al.*, 1998; López *et al.*, 2001).

7.1. Regulones conservados

El conocimiento que se tiene sobre los genes de la fijación de nitrógeno en *S. meliloti*, *A. caulinodans* y *B. japonicum*, se resume en la existencia de dos regulones conservados.

El primer regulón está compuesto por los genes *nif* y *fix*. Muchos genes *nif* de las bacterias rizobiáceas son homólogos con los genes *nif* de *K. pneumoniae*, pero su regulación no es tan estricta como en *K. pneumoniae*, mientras que los genes *fix* no presentan la homología mencionada. Además de *nif* y *fix*, esta región regulatoria contiene genes de otras clases que codifican varias proteínas, principalmente proteínas redox, como ferredoxinas (FdxN y FixX) y flavoproteínas (FixA y FixB) (Foussard *et al.*, 1998).

El segundo regulón está integrado por genes que participan en el metabolismo de oxígeno y la producción de energía. En esta región están contenidos los operones *fixNOQP* (Preisig *et al.*, 1996a) y *fixGHIS* (Preisig *et al.*, 1996b) responsables de la síntesis de la oxidasa terminal *cbb₃*. Estos operones se activan bajo condiciones microóxicas por el sistema regulatorio FixLJ (David *et al.*, 1988).

La organización genética de los regulones varía en cada género. Los genes se agrupan en diferentes operones, los mismos operones pueden estar agrupados en diferentes clusters, y los clusters ser acarreados por diferentes replicones (Foussard *et al.*, 1998).

7.2. NifA

NifA (*nifA*) es el activador transcripcional de los genes encargados de la fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*) en numerosos diazótrofos. Esta proteína es capaz de detectar cambios redox ambientales, y actúa formando un complejo con la polimerasa σ^{54} (Bauer *et al.*, 1999).

Experimentos *in vivo* dieron a conocer que el oxígeno afecta la capacidad de NifA para formar el complejo con la polimerasa σ^{54} . El oxígeno puede unirse de manera irreversible, inhibiendo a NifA (Morett *et al.*, 1991).

7.3. FixLJ

Ya que las bacterias efectúan la fijación de nitrógeno bajo condiciones limitantes de nitrógeno y oxígeno, es necesaria la existencia de mecanismos para regular la expresión de los genes *nif* y *fix* en respuesta a cambios en la concentración ambiental de oxígeno. Los mecanismos que regulan esta expresión genética varían de una especie bacteriana a otra. Dependiendo de la especie, la regulación puede involucrar modificaciones a nivel transcripcional y/o post-transcripcional de los genes *nif* y *fix* (Bauer *et al.*, 1999).

En las bacterias rizobiáceas se han estudiado con profundidad los mecanismos que regulan la transcripción de *nifA* en función del oxígeno. Las proteínas encargadas de dicho control, junto con NifA, son FixL y FixJ, proteínas que inducen la transcripción de los genes *nif* y *fix* cuando la concentración de oxígeno es baja (Fischer, 1994). FixLJ es un sistema de transducción de señales de dos componentes, donde FixL actúa como una cinasa y FixJ como un regulador que se une al ADN (Bauer *et al.*, 1999).

La transcripción de la nitrogenasa no se regula de igual forma entre estas bacterias. Se sabe que en *R. meliloti* FixLJ regula la expresión de *nifA* en condiciones microaeróbicas mediante un control indirecto, requiriendo como activador intermedio el gene *fixK* (Soupène *et al.*, 1995). En *B. japonicum*, FixLJ activa la expresión aeróbica de FixK2, el cual activa al factor σ^{54} , que activará a *nifA* (Bauer *et al.*, 1999). Otros autores mencionan que en *B. japonicum*, NifA también es capaz de estimularse mediante autoactivación en condiciones microaeróbicas, llegando a expresarse incluso en condiciones aeróbicas (Foussard *et al.*, 1998). Aunque FixLJ tiene un papel muy importante en la regulación de los genes *nif* y *fix*, parece que en *R. etli* la expresión de *nifA* tampoco está bajo el control de FixLJ (Foussard *et al.*, 1998).

Se ha observado que las proteínas FixL son miembros de una nueva clase de hemoproteínas especializadas como sensores de señales, cuya alta afinidad hacia el oxígeno las distingue de otras proteínas que actúan como transportadores. FixL se emplea como un excelente modelo en el estudio de la transducción de señales intramoleculares en proteínas sensoras, y es capaz de responder al oxígeno *in vitro* (Foussard *et al.*, 1998). No obstante, a diferencia de las proteínas FixL de *S. meliloti* y de otras especies, la proteína FixL de *R. etli* no contiene un grupo hemo (D'hooghe *et al.*, 1998).

7.4. Sistemas globales de regulación

Dada la importancia del oxígeno como factor regulador de la fijación de nitrógeno, es necesario explicar los sistemas Fnr y Arc. Fnr y Arc son sistemas bien descritos en *E. coli*, que regulan la expresión de citocromos en función del oxígeno (Membrillo, 1991).

Se sabe que ambos sistemas coordinan cambios en la expresión genética al haber crecimiento en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Por ejemplo, Arc y Fnr se unen al promotor del operón *cydAB*, el cual codifica la citocromo d oxidasa en *E. coli* (Cotter *et al.*, 1997).

Los sistemas Arc y Fnr aseguran que se utilice el proceso generador de mayor energía de acuerdo al medio donde se encuentra la bacteria (Spiro y Guest, 1991).

7.4.1. Arc

El sistema **Arc** (**Aerobic respiration control**) es un sistema transductor de señales de dos componentes (ArcB-ArcA) que fue descubierto al estudiar mutantes de *E. coli* que expresan la succinato deshidrogenasa y otras enzimas aeróbicas en condiciones anaerobias (Membrillo, 1991). ArcB es una proteína anclada a la membrana que se autofosforila en respuesta a la limitación por O₂, catalizando la fosforilación de ArcA, que regula la expresión genética de las citocromo oxidases terminales (Iuchi y Lin, 1988; Iuchi *et al.*, 1989; Miranda, 1995).

El estudio de mutaciones en el sistema Arc ha revelado que ArcB-ArcA actúa como un regulador global de la expresión genética. El sistema Arc regula la expresión de diversas enzimas como deshidrogenasas, citocromo oxidases terminales, y enzimas participantes en el ciclo del glioxilato y en el ciclo del ácido cítrico (Bauer *et al.*, 1999).

7.4.2. Fnr

El sistema **Fnr** (**Fumarate and nitrate reduction**) fue descrito al aislar mutantes incapaces de inducir a las enzimas fumarato reductasa y nitrato reductasa en condiciones anaerobias, mutantes llamados Fnr (Guest y Lambden, 1976; Membrillo, 1991).

Fnr es un sistema global que controla la regulación tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, y se sabe que afecta a más de 120 genes en *E. coli* (Bauer *et al.*, 1999). Fnr regula la transcripción de varias enzimas, tanto positiva como negativamente, y es capaz de autorregularse (Spiro y Guest, 1991). En particular, Fnr activa la expresión de enzimas

del ciclo de Krebs en condiciones anaerobias, como la succinato deshidrogenasa, la fumarasa y la isocitrato deshidrogenasa. Fnr también puede actuar como un regulador negativo al reprimir la acción de diversas enzimas como NADH deshidrogenasas y citocromo oxidasas terminales (Bauer *et al.*, 1999). Por ejemplo, Fnr reprime la expresión del citocromo o (*cyoABCDE*) y del citocromo d (*cydAB*) en *E. coli* (Cotter *et al.*, 1990).

Se ha encontrado que en su acción y estructura, Fnr tiene muchas similitudes con la proteína CAP que une AMP cíclico a diversos genes catabólicos (Miranda, 1995). También se ha demostrado que varios genes cuya expresión es afectada por cambios en las condiciones de crecimiento, están controlados por Fnr (Bauer *et al.*, 1999).

En *R. etli* las proteínas tipo Fnr tienen un papel destacado, como se verá enseguida.

7.5. Regulación de la expresión de la oxidasa terminal *cbb₃* (*fixNOQP*)

En el caso de la oxidasa simbiótica *cbb₃*, tiene especial importancia el estudio de la regulación del operón *fixNOQP*, el cual permite una respiración eficiente bajo las condiciones extremadamente microaeróbicas del bacteroide (*ca.* 10 nM O₂ disuelto) (Foussard *et al.*, 1998).

En *B. japonicum*, la expresión de *fixNOQP* está regulada mediante el sistema FixLJ, el cual activa la expresión de FixK, un regulador tipo Fnr. FixK controla negativamente su propia expresión y regula positivamente al operón *fixNOQP* (David *et al.*, 1988; Batut *et al.*, 1989).

Se han descubierto operones *fixNOQP* reiterados en las bacterias rizobiáceas. *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* poseen dos copias de *fixNOQP*, necesarias para lograr la mejor fijación de nitrógeno (López *et al.*, 2001).

En *R. etli* también existen dos operones *fixNOQP*, uno localizado en el plásmido simbiótico (*fixNOQPd*) y el otro localizado en el plásmido críptico (*fixNOQPf*) (Soberón *et al.*, 1999). El operón necesario para establecer una simbiosis efectiva es *fixNOQPd* (Girard *et al.*, 2000). Se sabe que una mutación en *fixL* elimina la expresión de *fixNOQPf*, pero sólo tiene un efecto moderado en la expresión de *fixNOQPd* (López *et al.*, 2001).

Además, se conoce la existencia de dos genes homólogos *fnrN* en *R. etli*, uno localizado en el plásmido simbiótico (*fnrNd*) y el otro localizado en el cromosoma (*fnrNchr*). Estudios de la expresión genética en mutantes demuestran que ambos genes están diferencialmente regulados, ya que únicamente se expresa *fnrNd* en cultivos microaeróbicos de la cepa silvestre,

mientras que *fnrNchr* está negativamente controlado por FixL. Se ha concluido que *fnrNd*, *fnrNchr* y *fixL* forman un circuito regulatorio que induce la expresión de *fixNOQP* durante la simbiosis. De acuerdo con esto, la regulación de *fixNOQP* en *R. etli* es sorprendente debido al número de interacciones putativas entre las proteínas regulatorias, incluyendo el control por un circuito inusual FixL-FixKf-FnrNchr-FnrNd, sin la participación de la proteína convencional FixJ (López *et al.*, 2001).

8. Panorama de las investigaciones en bacterias rizobiáceas

Los problemas relacionados con el uso inmoderado de fertilizantes han motivado un mayor estudio de la FSN por grupos científicos de todo el mundo desde hace varios años. En los últimos 20 años se ha incrementado exponencialmente el conocimiento gracias a la tecnología de ADN recombinante. En los últimos tres años se ha obtenido la secuencia de los genomas completos de *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 (Kaneko *et al.*, 2000), *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) y *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002). Está en proceso la secuenciación del genoma de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, con un avance del 99% (The Wellcome Trust Sanger Institute, Inglaterra: http://www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum). También se ha obtenido la secuencia de ciertos elementos, como la isla simbiótica cromosomal de *Mesorhizobium loti* R7A (Sullivan *et al.*, 2002) y el plásmido simbiótico pNGR234a de la cepa *Rhizobium spp.* NGR234, capaz de nodular más de 110 géneros de leguminosas (Freiberg *et al.*, 1997). En México está en marcha la secuenciación del genoma de *Rhizobium etli* CFN042 en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la UNAM (<http://www.cifn.unam.mx/replidb>), que ya publicó la secuencia completa del plásmido simbiótico p42d (González *et al.*, 2003).

Las secuencias genómicas están disponibles en las bases de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) y Rhizobase (Kazusa Research DNA Institute, Japón: <http://www.kasuzo.or.jp/rhizobase>). Ambos sitios contienen vínculos a los artículos originales de investigación y a las páginas web de cada proyecto de secuenciación.

La fijación de nitrógeno así como su regulación y relación con otras vías metabólicas, involucra muchas clases de genes relacionados con diferentes proteínas y funciones: nitrogenasa (genes *nif*), proceso de nodulación (genes *nod*, *nol*, *noe*, *syr*), biosíntesis de exopolisacáridos y lipopolisacáridos (genes *exo*, *lps*, *exp*, *fixF*, *phb*), glucanos (genes *ndv*), lectinas (genes *lec*), transporte de dicarboxilato (genes *dct*), reciclado de hidrógeno a través de la enzima hidrogenasa (genes *hup*, *hyx*, *hox*), chaperonas específicas de la simbiosis (genes *groESL*), citocromos (genes *fbcFH*, *cydHJKL*, *fixNOQP*, *fixGHIS*, *ccmAB*, *ccmIEFH*, *cycY*, *cycHJKL*, *cycVMX*, *nuo*), ferredoxinas (genes *fdx*), tiorredoxinas (genes *tlp*), quimiotaxis (genes *che*), tolerancia a la acidez (genes *act*), transferencia conjugativa de elementos genómicos como la isla simbiótica (genes *tbr*), adenil ciclasas (genes *cya*), competitividad en la nodulación (genes *nfeD*), ligninasa (genes *lig*) y otras enzimas que degradan la pared celular durante el proceso de infección, genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos como glutamina sintetasa (genes *gln*), genes relacionados con otros procesos del ciclo del nitrógeno, como la enzima nitrato reductasa (genes *mnr*), el factor de la polimerasa σ^{54} o factor rpoN (genes *ntrA*), genes regulatorios de otras clases (genes *ntr*, *syr*, *chv*, *nol*), antibióticos como trifolitoxina (genes *tx*). Cada día se hacen nuevos descubrimientos sobre la genética de estos procesos, se confirman o modifican modelos de síntesis y regulación, y se descubren genes inesperados e indispensables para los procesos de infección o fijación de nitrógeno.

La genética de estos procesos es sumamente compleja. Cada proceso involucra un alto número de genes. Por ejemplo, en el genoma de *Mesorhizobium loti* se han identificado 39 genes relacionados con la nodulación, y 46 con la FSN (Kaneko *et al.*, 2000); en el metabolismo de exopolisacáridos de *Sinorhizobium meliloti* se conocen 22 genes (Galibert *et al.*, 2001); tan sólo en el proceso de reciclado de hidrógeno se han identificado 120 genes involucrados en diversas especies (Maier y Triplett, 1996).

Además de la cantidad de información, hay que añadir que la organización genómica de las α -proteobacterias no es convencional, y los elementos extracromosomales como los plásmidos son parte importante del genoma (Jumas-Bilak *et al.*, 1998). Existen genes reiterados como *fixNOQP* (López *et al.*, 2001) o *fnrN* (Gutiérrez *et al.*, 1997); en otros casos se han registrado múltiples enzimas de la misma clase, como 26 adenilato ciclasas identificadas en *Sinorhizobium meliloti* (Téllez-Sosa *et al.*, 2002). La información genética se agrupa de

diferente manera en cada organismo, y los genes relacionados con la FSN se distribuyen entre cromosomas, plásmidos e islas simbióticas. Los ejemplos abundan. En el caso de *R. etli*, la organización también es compleja: los genes *nod* y *fix*, esenciales para la FSN, se localizan en el plásmido d, mientras que los genes de otros procesos relacionados con la simbiosis, como la síntesis de polisacáridos, se localizan en el plásmido b (Brom *et al.*, 1992). Estos genomas presentan una evolución muy dinámica: Los compartimientos simbióticos de las bacterias rizobiáceas son estructuras de mosaico resultantes de fenómenos de recombinación, transferencia horizontal y transposición (González *et al.*, 2003). Por ejemplo, se sabe que en la isla simbiótica cromosomal de *Bradyrhizobium japonicum* se encuentra el 60% de las transposasas del genoma completo (Kaneko *et al.*, 2002).

La enorme diferencia entre cepas y especies afecta de manera drástica los resultados de la FSN. Por ejemplo, una de las interacciones más efectivas que existe es la simbiosis *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* (alfalfa). Los nódulos de alfalfa pueden obtener hasta 80% del nitrógeno total del aire, mientras que los nódulos de frijol derivan solamente 40% de su nitrógeno del aire (Hardarson, 1993). Esto provoca, por ejemplo, que se dediquen más esfuerzos a estudiar la interacción entre alfalfa y *S. meliloti*, ya que los incrementos en la FSN son mayores en las plantas inoculadas con *S. meliloti* (hasta de 40 o 50% en invernadero) que en las plantas inoculadas con *R. etli* (menores al 25% en invernadero).

En los últimos 15 años se han realizado muchos acercamientos a nivel molecular para aumentar la eficiencia de las interacciones bacteria-hospedero, e incrementar el potencial de la FSN por medio de la manipulación genética (consúltese las revisiones de Maier y Triplett, 1996; Sessitsch *et al.*, 2001). Ejemplos de investigaciones realizadas son: el diseño de un gene híbrido que estimula la nodulación sin que haya excreción de flavonoides por parte de la planta (Spaink *et al.*, 1989), las cepas recombinantes *dct-nifA* (Bosworth *et al.*, 1994), mutaciones en el sistema *ntr* (Soberón *et al.*, 1999; Oláh *et al.*, 2001), mutantes de los genes *nod* para realizar la FSN aún en presencia de nitrógeno externo (Dusha *et al.*, 1989), auxótrofos de aminoácidos (Ferraioli *et al.*, 2002), y mutantes con una FSN mejorada al alterar su metabolismo aeróbico (en la discusión se expondrán detalladamente algunos ejemplos). Con el desarrollo de la ingeniería genética se espera que al clonar los genes relacionados con la FSN, podrían obtenerse mutantes que desempeñen este proceso con mayor eficiencia. Durante los años ochenta varias

compañías se interesaron en producir cepas para uso comercial agrícola, siendo el ejemplo más significativo la cepa recombinante de *S. meliloti* RMBPC-2, desarrollada por las compañías BioTechnica International y Research Seeds. Este microorganismo tiene una expresión incrementada del gene *dctABD* y copias múltiples del regulador positivo *nifA*. Plantas de alfalfa inoculadas con esta cepa tuvieron un incremento en su biomasa de 13% respecto a plantas inoculadas con la cepa silvestre (Bosworth *et al.*, 1994). El uso comercial de la cepa RMBPC-2 fue aprobado en 1997 por las autoridades de Estados Unidos (Sessitsch *et al.*, 2002).

Pese a haberse desarrollado y patentado otros microorganismos, han fallado muchos intentos de mejorar la FSN por medio de la clonación genética, habiendo pocos ejemplos significativos. Muchas cepas que funcionan bien a nivel invernadero, fallan en el campo. Este fenómeno tiene muchas causas: un diseño experimental pobre, factores extrínsecos diversos (interacción bacteria-planta, condiciones edáficas, desconocimiento sobre la regulación del metabolismo, restos de fertilizantes en el suelo que impiden la nodulación), así como competencias establecidas con las cepas indígenas de los suelos, las cuales muchas veces impiden el desarrollo de la bacteria inoculada. Por ejemplo, con *B. japonicum* y soya frecuentemente se obtienen rendimientos muy altos debido a que estos organismos se introducen en nichos ecológicos vacíos donde no existe competitividad contra otras bacterias, siendo muy buena la respuesta por parte del suelo. Muchas ocasiones se logran experimentos exitosos que no pueden repetirse (Maier y Triplett, 1996).

Existen otros obstáculos que impiden avances en las investigaciones, como el temor a la comercialización de los organismos transgénicos, o las regulaciones legales necesarias para liberar dichos organismos al mercado. La razón principal de la falta de investigación es económica: Las compañías desisten de invertir en el mejoramiento genético de cepas por falta de rentabilidad (las cepas tienen un precio muy bajo en el mercado: US \$0.50/Ha). Además, los rendimientos en el campo son inferiores a los resultados de laboratorio, teniendo en promedio entre 5 y 15% de aumento en la FSN de organismos modificados en los genes *hup* o *nifA/dct*. Maier y Triplett (1996) señalan que sin inversión privada no es viable el diseño de mejores cepas inoculantes.

Sin embargo, esta falta de rentabilidad podría impedir una mayor productividad e incremento en las utilidades. Aún cuando un aumento de 5-15% en la FSN aparentemente no vale la pena, se ha calculado que una mejora de 10% representaría un beneficio económico de US \$1,000 millones para la agricultura mundial (Herridge y Rose, 2000). Nótese que el precio de las bacterias inoculantes como costo de producción (50 centavos de dólar por hectárea) es ínfimo en comparación con el costo de los fertilizantes (de 80 a 150 dólares por hectárea), sin pensar en el costo ambiental de estos productos, por lo que las compañías deberían analizar con más atención los costos y los beneficios de construir cepas inoculantes mejoradas.

En el campo de la FSN, se han realizado avances importantes, mas no revolucionarios. Por ejemplo, aunque era difícil regenerar la mayoría de las leguminosas transgénicas (Rocha y De Las Peñas, 1990), se han desarrollado nuevas metodologías que permiten la creación y reproducción de dichos organismos. En los últimos años se construyeron plantas transgénicas de *Lotus corniculatus* (van Rhijn *et al.*, 1998) y de *Medicago sativa* (van Rhijn *et al.*, 2001), en las cuales se clonó el gene de la lectina de soya. Así, estas plantas que no son noduladas por *B. japonicum* en condiciones normales, al ser modificadas genéticamente ya pueden ser noduladas por *B. japonicum* y otras especies extrañas. Otro ejemplo es la inserción del plásmido críptico de *R. tropici* en *R. etli*, que provoca un aumento en la nodulación de frijol (Sessitsch *et al.*, 2002).

Con base en el nuevo conocimiento de la simbiosis, se han visualizado estrategias útiles para elevar la FSN. Una de las principales consiste en la transferencia de genes *hup* (*hydrogen uptake*) entre diferentes rizobiáceas, para construir cepas capaces de reciclar el hidrógeno. El hidrógeno es un producto de reacción de la nitrogenasa, cuya generación es uno de los factores que más afectan la eficiencia de la FSN, consumiendo hasta 40 o 60% de la energía proveniente de la CTE, lo cual constituye un desperdicio de energía química. Algunas cepas de bacterias rizobiáceas poseen la enzima hidrogenasa (codificada por los genes *hup*), capaz de reciclar el hidrógeno. El proceso de reciclado consiste en la oxidación del hidrógeno por parte de la hidrogenasa, canalizando la energía recuperada a la nitrogenasa. Se han logrado aumentos en la FSN de 17% en plantas inoculadas con cepas portadoras de los genes *hup* (Maier y Triplett, 1996), y las investigaciones continúan (*cfr.* Baginsky *et al.*, 2002).

9. Futuro de las investigaciones sobre la FSN

En un principio, las expectativas de explotación de la simbiosis leguminosa-rizobiácea fueron muy altas. Se pensó que podrían elaborarse plantas transgénicas de trigo o maíz capaces de fijar nitrógeno (Westhoff, 1998). Sin embargo, la simbiosis es un fenómeno extremadamente complejo cuya manipulación genética sigue siendo incipiente. Implantar la fijación de nitrógeno en las plantas por medio de la ingeniería genética requiere resolver problemas de tipo transcripcional, traduccional y regulatorio, por lo que se están estudiando otras posibilidades de mejorar la FSN mediante estrategias como la introducción de genes *hup* en cepas que carecen de ellos (Glick y Pasternak, 1998).

Pese a estas dificultades, la FSN es un proceso natural, limpio y racional en el uso de energía, cuya investigación es necesaria para favorecer la agricultura sustentable. La FSN tiene un gran potencial para resolver problemas agrícolas y ambientales. Por todas estas razones, es necesario incrementar el conocimiento sobre la FSN mediante la investigación básica.

ANTECEDENTES

Una de las metodologías más tradicionales al estudiar el metabolismo en cualquier organismo, es mediante una mutación inducida. El cambio en el genotipo del organismo afectado puede producir un cambio visible en su fenotipo, lo cual permite aislar a este mutante para demostrar la función de un gene (Gardner *et al.*, 1998).

Una manera de inducir mutaciones es con el uso de transposones. Los transposones son segmentos discretos de ADN que pueden movilizarse entre sitios no homólogos, dentro o fuera de la molécula de origen, mediante un proceso llamado transposición. La transposición es un mecanismo importante en la generación de diversidad genética, y se ha sugerido su uso en terapia génica humana (Craig, 2002; Reznikoff, 2003). Se sabe que, en las bacterias, los transposones son elementos responsables de la recombinación de algunos genes que controlan la resistencia a ciertos fármacos (Gardner *et al.*, 1998).

El transposón Tn5, aislado de *Escherichia coli*, es una molécula de 5.8 kb que porta genes de resistencia a kanamicina, neomicina y estreptomicina. Tn5 es un excelente modelo para entender las bases moleculares de la transposición y otros procesos importantes, como la integración del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) al ADN (Reznikoff, 2002 y 2003).

En nuestro estudio empleamos un derivado del transposón Tn5: el Tn5-*mob*, de 7.1 kb. Este transposón se construyó clonando el sitio *mob* del plásmido RP4 de *E. coli* en el sitio *Bam*HI del Tn5 silvestre. El sitio *mob* contiene el origen de replicación del plásmido RP4 o RK2, cuyas funciones permiten la transferencia del Tn5-*mob* a otras bacterias Gram negativas mediante conjugación (Simon, 1984). Tn5-*mob* ha sido una de las herramientas más poderosas en la manipulación genética de bacterias, ya que se transpone aleatoriamente en sus hospederos, obteniéndose mutantes estables no reversibles. El mapeo genético con inserciones de Tn5-*mob* es un método rápido y viable que permite localizar nuevas mutaciones (Hynes y Finan, 1998). Tn5-*mob* ha sido muy útil para estudiar la genética de las bacterias rizobiáceas.

Esta tesis es parte de un proyecto dirigido por el Dr. Juan Miranda Ríos y por el Dr. Mario Soberón Chávez. En el proyecto se estudian los mecanismos moleculares que regulan la expresión genética de las diferentes cadenas respiratorias de *Rhizobium etli* en vida libre y en simbiosis.

En el grupo del Dr. Mario Soberón se han aislado y estudiado varias cepas mutantes de *Rhizobium etli*, con la finalidad de caracterizar algunos genes involucrados en la expresión de las citocromo oxidasas terminales y la fijación simbiótica de nitrógeno.

Dos de las primeras cepas mutantes aisladas fueron la cepa CFN4201 y la cepa CFN4205, obtenidas con el Tn5-*mob* y con nitrosoguanidina, respectivamente. Estas mutantes se seleccionaron en base a su alta capacidad (fenotipo TMPD⁺⁺) para oxidar al colorante N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD), el cual es oxidado por la cadena respiratoria a nivel de citocromos tipo c y tipo a (Soberón *et al.*, 1989).

Otra cepa mutada con Tn5-*mob* es la cepa CFN037, aislada por su fenotipo TMPD⁺⁺ (Soberón *et al.*, 1990). La cepa CFN037, cuyo estudio es un antecedente importante de este trabajo, posee incrementos tanto en la respiración como en la fijación simbiótica de nitrógeno, y ha sido ampliamente caracterizada (Miranda *et al.*, 1996; Miranda-Ríos *et al.*, 1997 y 2001).

El objeto de estudio de esta tesis es la cepa CFN030. La cepa CFN030 se obtuvo mediante mutagénesis de la cepa silvestre CE3 empleando el Tn5-*mob*, y fue seleccionada por presentar un fenotipo resistente a azida (Az^R) (Miranda *et al.*, 1996).

Se decidió emplear la resistencia a azida de sodio como método de selección, con la finalidad de entender mejor los mecanismos moleculares involucrados en la expresión de citocromos en *R. etli*. La razón para escoger mutantes capaces de crecer en presencia de azida es que la cepa CFN037, cuya respiración y fijación simbiótica de nitrógeno han sido alteradas, también muestra el fenotipo Az^R (Miranda *et al.*, 1996). Cabe señalar que la cepa CFN037 no fue seleccionada por el fenotipo Az^R sino por mostrar un fenotipo TMPD⁺⁺. Esta cepa fue aislada con anterioridad (Soberón *et al.*, 1990), y posteriormente se observó su fenotipo Az^R (Miranda *et al.*, 1996). Se sabe que la cepa CFN037 sufrió una sola inserción del Tn5-*mob* en el plásmido b, afectando la expresión de los genes biosintéticos de tiamina (Miranda *et al.*, 1996; Miranda-Ríos *et al.*, 1997). En contraste, la cepa CFN030 sufrió una sola inserción del Tn5-*mob* en el cromosoma (Miranda *et al.*, 1996), lo que sugiere que los genes afectados en la cepa CFN030 por la inserción del Tn5-*mob*, son diferentes a los genes afectados en la cepa CFN037. No se conoce la naturaleza de estos genes, por lo que se decidió clonarlos y caracterizarlos en esta tesis.

La azida es un inhibidor de la cadena respiratoria similar al cianuro (Sies *et al.*, 1969; McKee y McKee, 1996). Como actúa a nivel de oxidasas terminales, es lógico pensar que en una bacteria la resistencia a azida puede deberse a la expresión de oxidasas terminales que no se expresan en condiciones normales, con un posible incremento en la respiración y en la síntesis de ATP. Sin embargo, también podría no existir una relación entre el fenotipo Az^R y el transposón Tn5-*mob*. Se sabe que en *Escherichia coli* muchas mutantes Az^R tienen mutaciones puntuales en el gene *secA*, que codifica para una ATPasa involucrada en el transporte de proteínas (Fortin *et al.*, 1990; Oliver *et al.*, 1990), por lo que fue necesario demostrar que el fenotipo Az^R de la cepa CFN030 está relacionado con la inserción del transposón, y no con otras clases de mutaciones como las del gene *secA*.

Para llevar a cabo la demostración, se introdujo el plásmido pJB3 en la cepa CFN030 con el objeto de transferir la secuencia *mob* del transposón a otra cepa, y observar el fenotipo. Se conjugó la cepa CFN030/pJB3 con una cepa de *R. etli* resistente a rifampicina y sensible a azida y kanamicina. La clona transconjugante, resistente a rifampicina y kanamicina, conservó la resistencia a azida, lo que demuestra que el fenotipo Az^R de la cepa CFN030 se debe a la inserción del Tn5-*mob* en su genoma, y no a otra clase de mutaciones. La inserción del Tn5-*mob* también es responsable de la resistencia a kanamicina (Membrillo, 1991; Miranda *et al.*, 1996).

La cepa CFN030 fue caracterizada bioquímicamente mediante espectroscopía de citocromos y ensayos de actividad reductora de acetileno (ARA). Las plantas de frijol inoculadas con esta cepa presentan un contenido total de nitrógeno 25% mayor en comparación con las plantas inoculadas con la cepa silvestre CE3. La actividad enzimática de la nitrogenasa alcanza los mayores niveles en las plantas inoculadas con la cepa CFN030 al menos cuatro días antes que en las plantas inoculadas con la cepa silvestre. Otras características fenotípicas de la cepa CFN030, similares a las de la cepa CFN037, son: La expresión reprimida de la oxidasa terminal aa₃ en cultivos microaeróbicos, que no se expresa en la cepa silvestre salvo en condiciones aeróbicas; y la expresión de la oxidasa terminal cbb₃ en la fase post-exponencial del crecimiento en vida libre, a diferencia de la cepa silvestre, donde esta oxidasa terminal no se expresa excepto durante la simbiosis (Miranda *et al.*, 1996).

Es importante saber qué genes de la cepa CFN030 han sido afectados, para entender más el proceso de la fijación de nitrógeno.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar a nivel molecular el gene mutado por la inserción del Tn5-*mob* en la cepa CFN030.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Clonar un fragmento *Eco*RI de 5 kb, detectado previamente por medio de una hibridación, que contiene el gene mutado por la inserción del Tn5-*mob*.
- b) Obtener la secuencia nucleotídica del fragmento *Eco*RI e identificar los ORFs correspondientes.
- c) Comparar la secuencia obtenida con la información genética de otros organismos disponible en bases de datos, para averiguar más sobre la naturaleza del gene afectado.
- d) Analizar la información que proporcionen los bancos de genes.
- e) Realizar un estudio de complementación genética para observar la expresión del gene clonado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos empleados se muestran en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepa	Características importantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i> : DH5 α S17-1	Cepa hospedera de los plásmidos, <i>lac z</i> Δ M15 Plásmido RP4 integrado en el cromosoma, Tc ^R	Gibco Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>Rhizobium etli</i> : CE3 CFN030 CE3/pRK7813 CFN030/pRK7813 CE3/pFVRK CFN030/pFVRK	Cepa silvestre, Sm ^R CE3/Tn5- <i>mob</i> , Az ^R , Km ^R Cepa control en la complementación Cepa control en la complementación Cepa caracterizada mediante complementación Cepa caracterizada mediante complementación	Noel <i>et al.</i> (1984) Miranda <i>et al.</i> (1996) Este trabajo Este trabajo Este trabajo Este trabajo

Tabla 8. Plásmidos utilizados.

Plásmido	Características importantes	Referencia
pSK pRK7813 Cósmido 6.63	Vector de clonación, Ap ^R Plásmido RP4 replicable en <i>Rhizobium</i> , Tc ^R Cósmido con ADN de <i>R. etli</i> del cual se clonó un fragmento <i>EcoRI</i> de 5 kb donde se detectó la inserción del Tn5- <i>mob</i> en la cepa CFN030	Stratagene Jones y Guttererson (1987) Este trabajo
pSK-030 pFV pFVRK	Sonda para detectar el fragmento <i>EcoRI</i> , Km ^R Fragmento <i>EcoRI</i> clonado en pSK, Tc ^R , Ap ^R Fragmento <i>EcoRI</i> clonado en pRK7813, Tc ^R	Este trabajo Este trabajo Este trabajo

Medios y condiciones de cultivo

Medio LB: Triptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.4

Medio PY: Peptona de caseína 0.5%, Extracto de levadura 0.3%, CaCl₂ 10 mM

Medio MM: Succinato 1.35 g/L, KH₂PO₄ 1.5 mM, NH₄Cl 10 mM,
MgSO₄-7H₂O 0.5 mM, CaCl₂-2H₂O 2 mM

Para los medios sólidos se agregó 1.5% de agar, y el antibiótico adecuado según el caso: tetraciclina 20 µg/mL (Tc), ácido nalidixico 20 µg/mL (Nal), kanamicina 30 µg/mL (Km) y ampicilina 100 µg/mL (Ap). También se empleó azida de sodio 8-10-12 µg/mL (Az).

Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron a 37° C con agitación en medio LB. Las cepas de *Rhizobium etli* se crecieron a 30° C con agitación en medio PY, excepto en los experimentos de complementación genética, en que se usó el medio mínimo (MM).

Clonación genética

La obtención de ADN plasmídico, la digestión con enzimas de restricción, la separación de fragmentos digeridos mediante electroforesis, las reacciones de ligación y las transformaciones de *E. coli* fueron realizadas de acuerdo a los métodos establecidos (Sambrook *et al.*, 1989). Las enzimas de restricción utilizadas fueron *EcoRI* y *Sal I* (New England Biolabs). Para llevar a cabo las hibridaciones tipo Southern, se transfirió el ADN a membranas Hybond según el protocolo indicado (Southern, 1975); se marcaron los plásmidos con ³²P y se realizaron las hibridaciones siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia).

Se digirió el ADN genómico de la cepa CFN030 con *Sal I*, se realizó una hibridación tipo Southern contra *Tn5-mob* detectando un fragmento *Sal I* de 3 kb y se clonó en el vector pSK, llamando pSK-030 a esta nueva clona. El fragmento *Sal I* del pSK-030 contiene el gene Km^R del *Tn5-mob* y 527 pb del fragmento *EcoRI* de 5 kb mencionado a continuación.

Se llevó a cabo una hibridación en colonia utilizando el pSK-030 como sonda contra un banco genómico de la cepa *Rhizobium etli* CE3, que fue proporcionado por el Dr. Jorge Calderón Jiménez del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Huerta-Zepeda *et al.*, 1997). De dicho banco genómico hibridó positivamente el cósmido 6.63. Se extrajo el ADN del cósmido 6.63, se digirió con *EcoRI* y se hibridó contra pSK-030, detectándose señal positiva de un fragmento *EcoRI* de 5 kb que contiene la secuencia caracterizada en este trabajo.

El ADN del cósmido 6.63 fue aislado con la amable ayuda de Oswaldo López, siguiendo los métodos establecidos (Sambrook *et al.*, 1989). Dicho ADN fue digerido con *EcoRI*, se separaron las bandas en un gel de agarosa al 1%, y se purificó el fragmento *EcoRI* de 5 kb empleando un kit de extracción de gel (QIAGEN). Este fragmento se ligó con el vector pSK previamente digerido con *EcoRI*. Se transformó la cepa *E. coli* DH5 α con la ligasa. Se seleccionaron las colonias blancas, se verificó que contuvieran el inserto, y a la nueva clona se le denominó pFV. El fragmento *EcoRI* de 5 kb del pFV se clonó en otro vector, el pRK7813 (proporcionado gentilmente por María Luisa Tabche), y se le denominó pFVRK. Este nuevo plásmido sirvió para realizar los estudios de complementación genética.

Secuenciación de nucleótidos

La secuencia se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con un secuenciador ABI-Prism, usando el método de terminadores de cadena específicos. El fragmento fue secuenciado en ambas hebras empleando los cebadores descritos en los resultados. La posición de la inserción del Tn5-*mob* fue determinada con el uso de un cebador específico de dicho transposón. Todos los cebadores se elaboraron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología.

Análisis de la secuencia

El análisis de la secuencia de ADN se realizó con el programa Gene Works versión 2.5.6 (IntelliGenetics Corporation).

Las búsquedas de homologías se realizaron en las bases de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos) y Rhizobase (Kazusa DNA Research Institute, Japón), con el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Se reportan las homologías encontradas en la base GenBank, ya que no se encontraron homologías en la base Rhizobase. Los alineamientos de secuencias se realizaron con el programa MultAlin (Corpet, 1988).

Complementación genética

Con el plásmido pFVRK se transformó la cepa DH5 α seleccionando las colonias blancas. Se verificó que contuvieran el fragmento *Eco*RI de 5 kb. Se aisló ADN plasmídico de las nuevas clonas y se transformó la cepa S17-1 con dicho ADN mediante electroporación, seleccionando las colonias Tc^R. Se verificó que las clonas contuvieran el fragmento de 5 kb por medio de PCR. Para la prueba PCR se emplearon como control positivo ADN aislado del pFV, y como control negativo ADN del pRK7813. Los cebadores empleados fueron los oligonucleótidos 030-up y 030-4. El PCR se realizó así: un ciclo de 4 minutos a 92°C, 30 ciclos de duplicación (un minuto a 92°C, un minuto a 58°C y un minuto a 72°C), un ciclo de 5 minutos a 72°C, y enfriamiento hasta una temperatura de 4°C. Dos cepas candidatas dieron positivo el PCR, lo cual demuestra que contienen el fragmento deseado.

Se hicieron cruza biparentales entre dichas cepas de *E. coli* S17-1 y las cepas CE3 y CFN030 de *R. etli* siguiendo el protocolo establecido (Membrillo, 1991). Se seleccionaron las clonas NaI^R Tc^R para efectuar la complementación.

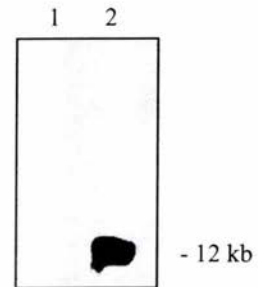
La complementación genética se realizó con las clonas CE3, 030, CE3/pFVRK, 030/pFVRK, CE3/pRK7813 y 030/pRK7813 (estas dos últimas cepas fueron usadas como control para determinar si el plásmido pRK7813 podía tener algún efecto sobre el fenotipo Az^R, y fueron proporcionadas amablemente por María Luisa Tabche). Todas las clonas se sembraron en MM en ausencia y presencia de azida de sodio (8, 10 y 12 μ g/mL), observando el crecimiento de cada colonia.

RESULTADOS

Caracterización del gene afectado por la inserción del Tn5-*mob* en la cepa CFN030

Previamente a este trabajo, se realizó el primer paso en la identificación del gene mutado de la cepa CFN030. Se purificó ADN genómico de la cepa CFN030, se digirió con *EcoRI* y se realizó una hibridación tipo Southern empleando el Tn5-*mob* como sonda. La hibridación reveló un fragmento *EcoRI* de 12 kb que contiene el Tn5-*mob* (figura 5).

Figura 5.
Hibridación tipo Southern de ADN digerido con *EcoRI*.
Sonda: transposón Tn5-*mob*
Cepas: CE3 (carril 1) y CFN030 (carril 2)
[Tomado de Miranda *et al.*, 1996]



En la figura 6 se muestra gráficamente dicho fragmento.

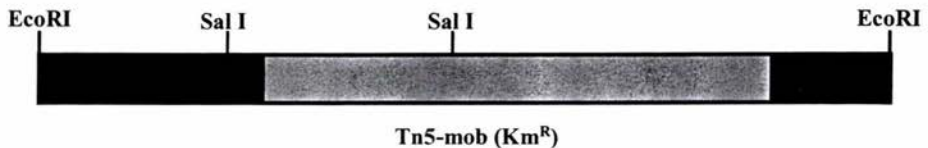


Figura 6. Fragmento *EcoRI* de 12 kb detectado en la cepa mutante. Este esquema es una representación gráfica del fragmento que hibrida en la figura 5. En color negro se muestra la región de ADN bacteriano cuya secuencia fue interrumpida por el Tn5-*mob*; este transposón se representa en color gris. La inserción del Tn5-*mob* no está ubicada con precisión dentro del fragmento.

Clonación del gene silvestre que fue mutado por la inserción del Tn5-mob

Se intentó clonar el fragmento *EcoRI* de 12 kb para emplearlo como sonda y buscar en un banco de cósmidos de *R. etli* un cósmido que contuviera el ADN silvestre que fue mutado, pero no pudo lograrse dicha clonación.

Como estrategia alterna para localizar el ADN mutado por el Tn5, se decidió hibridar utilizando como sonda el Tn5-mob, y como blanco el ADN total de la cepa CFN030, previamente digerido con varias enzimas de restricción. En particular, se notó que la digestión con la enzima *Sal I* dio dos bandas de hibridación bien definidas: una de 3 kb y otra de 6 kb. Los fragmentos *Sal I* fueron ligados con el vector pSK. Con los plásmidos resultantes se llevaron a cabo transformaciones, y se seleccionó una clona resistente a kanamicina (llamada pSK-030), cuyo inserto es el fragmento *Sal I* de 3 kb mostrado en la figura 7.

La clona pSK-030 contiene el gene del Tn5-mob que imparte la resistencia a kanamicina [gene señalado como Km^R, que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (NPTII), que detoxifica a la familia de la kanamicina por fosforilación de la misma (Gardner *et al.*, 1998)], y 527 pb del ADN de *R. etli* adyacente a la inserción del Tn5-mob. El plásmido pSK-030 se empleó para clonar el gene silvestre que fue afectado por el Tn5-mob (figura 7).

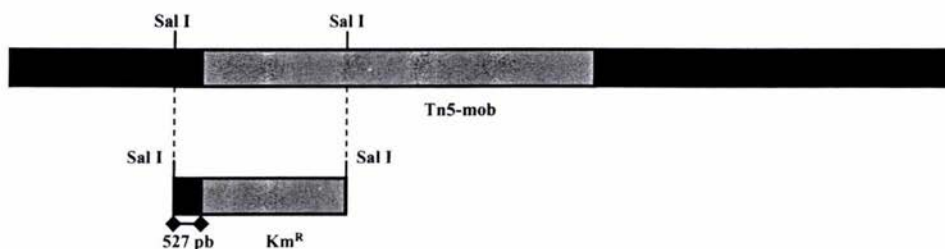


Figura 7. Construcción de la clona pSK-030.

De una digestión total del ADN de la cepa CFN030 efectuada con *Sal I*, se clonó un fragmento de 3 kb que hibridó contra el Tn5-mob. Este nuevo plásmido, denominado pSK-030, porta el gene de resistencia a kanamicina y un segmento de 527 pb que corresponden al ADN adyacente a la inserción del Tn5-mob en la cepa CFN030.

Con la finalidad de clonar el gene silvestre se hizo una hibridación en colonia utilizando un banco genómico de la cepa CE3 de *R. etli*, empleando como sonda el plásmido pSK-030, el cual contiene 527 pb de ADN bacteriano que hibridan positivamente (figura 8).

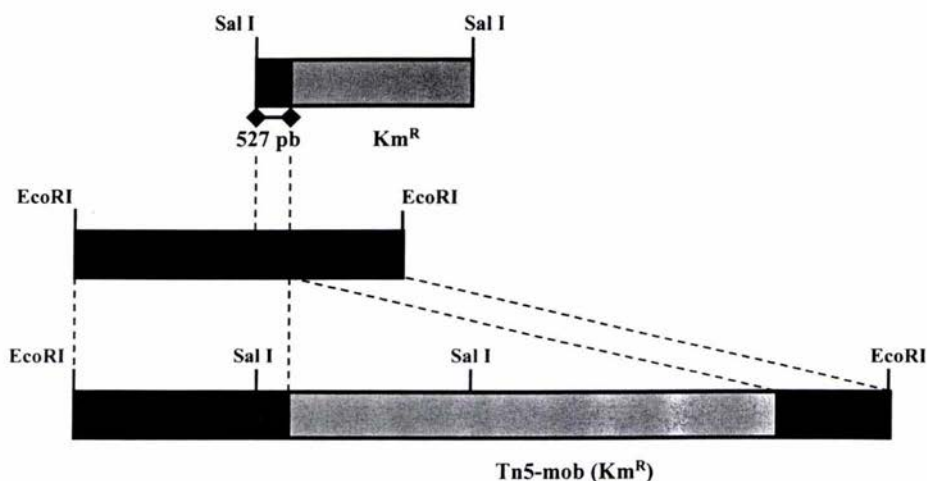


Figura 8. Fragmento *EcoRI* de 5 kb detectado en la cepa silvestre. Mediante una hibridación realizada en un banco de cósmidos de *R. etli*, empleando la clona pSK-030 como sonda, se identificó un cósmido denominado 6.63, el cual contiene un fragmento *EcoRI* de 5 kb que dio señal positiva en la hibridación. Dicho fragmento corresponde a la región de ADN mutada en la cepa CFN030 (figuras 5 y 6).

El banco genómico utilizado se trata de una librería de cósmidos que contienen fragmentos provenientes de una digestión parcial con *EcoRI* del ADN genómico de *R. etli*. Cada cósmido del banco contiene un fragmento aproximado de 20 kb proveniente de la digestión parcial *EcoRI*, clonado en el vector pLARF1. Cada fragmento de 20 kb contiene, a su vez, algunos o varios fragmentos *EcoRI* del ADN de *R. etli*, dado que los cósmidos se construyeron con una digestión parcial y no total de ADN. El vector pLARF1 (21.6 kb) contiene un sitio *EcoRI* único, es resistente a tetraciclina, y puede movilizarse y replicarse de forma estable en muchas bacterias Gram negativas (Friedman *et al.*, 1982). Este banco de cósmidos fue construido en *E. coli* HB101 (Huerta-Zepeda *et al.*, 1997).

La manera en que se llevó a cabo el tamizaje del banco genómico fue la siguiente:

Se crecieron 1200 colonias del banco de cósmidos en una membrana de nylon. Se lisaron las colonias para retirar los elementos celulares, dejando expuesto el ADN plasmídico. Se llevó a cabo una hibridación en colonia tipo Southern, empleando como sonda el plásmido pSK-030. De las 1200 colonias expuestas, únicamente hibridó un cósmido, denominado cósmido 6.63.

Se aisló ADN plasmídico del cósmido 6.63, se digirió con *EcoRI* y se hibridó empleando la sonda pSK-030 (figuras 9A y 9B). Se obtuvo hibridación en una banda de 5 kb, que era lo que se esperaba, ya que el *Tn5-mob* tiene un tamaño de 7 kb, que sumado con las 5 kb del ADN bacteriano, da un total de 12 kb, tamaño que tiene el fragmento *EcoRI* identificado en la hibridación de la cepa CFN030 (figura 5). El fragmento *EcoRI* del cósmido 6.63 contiene la zona de ADN bacteriano adyacente a la inserción del *Tn5-mob* en la cepa mutante. Con este fragmento se realizó la caracterización molecular de la cepa CFN030. Dicho fragmento fue aislado y clonado en el vector pSK. El plásmido resultante se denominó pFV (figura 9C).

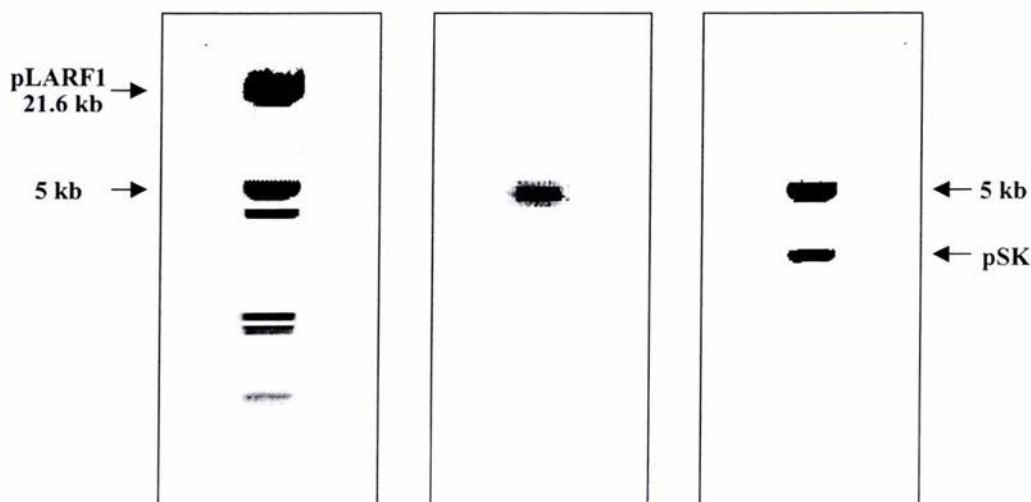


Figura 9

- A. Digestión *EcoRI* del cósmido 6.63
- B. Hibridación del ADN del cósmido 6.63 digerido con *EcoRI*
- C. Digestión con *EcoRI* del plásmido pFV, donde se señala el inserto de 5 kb que hibridó positivamente y fue clonado a partir del cósmido 6.63

Secuencia nucleotídica

En la figura 10 se muestra la estrategia para secuenciar el inserto del plásmido pFV.

El primer paso fue obtener la secuencia del inserto del plásmido pSK-030, utilizando como cebador el oligonucleótido Tn5 (5'-GTTCAGGACGCTACTTG-3'). Con este cebador, se obtiene la secuencia de las 527 bases de ADN bacteriano contenidas en el fragmento *Sal I* de 3 kb del plásmido pSK-030. Teniendo ya la secuencia, se diseñan los oligonucleótidos 030-up y 030-down (figura 10A):

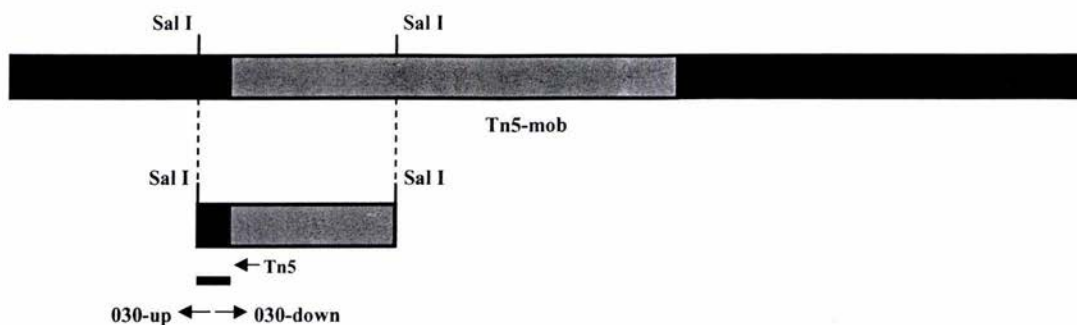
030-up	TTTCGGACAACGCTGGTGAG	(5'→3')
030-down	GGCTGCTGCCAAAGAGTGTC	(5'→3')

Posteriormente, al conocer la secuencia de nuevas regiones, se diseñaron otros oligonucleótidos para avanzar en la secuenciación del fragmento *EcoRI* de 5 kb (figura 10B):

030-1	GACTTCAATCCCGACCTCTG	(5'→3')
030-2	GCGCGGCATCCCCCAACATC	(5'→3')
030-3	ACGACGGAACCACGCCTCTC	(5'→3')
030-4	GTGGTTCGTCGTCGTCGAAG	(5'→3')

Se obtuvo la secuencia de 1880 pb del inserto de 5 kb del plásmido pFV. En la figura 11 se muestra la secuencia completa.

A



B

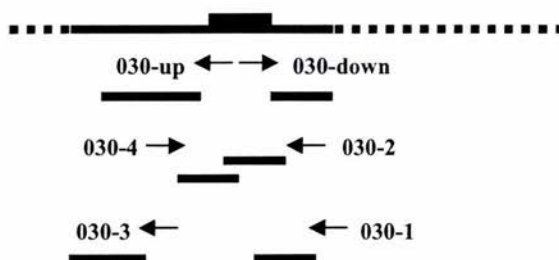


Figura 10. Estrategia de secuenciación del fragmento de 1.8 kb contenido en el pFV.

- A.** Secuenciación del inserto del plásmido pSK-030 (527 pb) a partir del cebador Tn5. Localización de los oligonucleótidos 030-up y 030-down.
- B.** Inserto de 5 kb del plásmido pFV (línea punteada). Como una línea negra se muestra la secuencia completa obtenida de 1880 pb, y como un rectángulo negro las 527 pb secuenciadas con el cebador Tn5 en el plásmido pSK-030. Se muestran las secuencias obtenidas a partir de otros cebadores empleados. La ubicación de las 1880 pb no se señala con precisión dentro del fragmento *EcoRI* de 5 kb.

GCGGTNGTCA TCCTCCAAGA TATGGGCGTG AATGGCTGCN NGCGCTTGCT 50
CGCCANCAGT AGGAGGTTC TATACCCGCAC TTACCGACGN NCGCGAACGA

NCCGCCGTCT TTGAGGTGAC ATCCAGATTC AGCGCAAACG GGTGTTGGGG 100
NGGCGGCAGA AACTCCACTG TAGGTCTAAG TCGCGTTTGC CCACAACCCC

AGCGAGGACC TGGGCTCTTC TGCTTTTCTC CCTCGATGCC TGCGCATCAA 150
TCGCTCCTGG ACCCGAGAAG ACGAAAAGAG GGAGCTACGG ACGCGTAGTT
*

TCGACTTTCA ACCGATCGCG ACGCGCCGGT GTGGCAACGC GACGTGCCAA 200
AGCTGAAAGT TGGCTAGCGC TGC CGCGCCA CACCGTTGCG CTGCACGGTT
D V K L R D R R A P T A V R R A L

CTCCTCCTCG TCGCAGAGCA ACCTCACGGG CACCAGCAGC GCCTCGCATT 250
GAGGAGGAGC AGCGTCTCGT TGGAGTGCCC GTGTCGTCG CGGAGCGTAA
E E E D C L L R V P V L L A E C

CTCGGGCCGC GCCGGCAATC TGCTGGAACG TGC GATTGCT GCGCTCATCA 300
GAGCCCGGCG CGGCCCTTAG ACGACTTGC ACGCTAACGA CCGGAGTAGT
E R A A G A I Q Q F T R N S R E D

CCTTCTATGC CGGCATGCGT GGAAATGAAA TTTGCCGAAG GAGGGCCATA 350
GGAAGATACG GCCGTACGCA CCTTTACTTT AAACGGCTTC CTCCCGGTAT
G E I G A H T S I F N A S P P G Y

GGCGACGATC GCATCCAGGA CGGCTTGGCG AACTCTTCCA ATATATTCCC 400
CCGCTGTAG CGTAGTCTCT GCCGAACCGC TTGAGAAGGT TATATAAGGG
A V I A D L V A Q R V R G I Y E

ATATTCCTTT CGGGAGAGGC gtggttccgt cgtcgtcaag CAGACGCAGT 450
TATAAGGAAA GCCctctccg caccaaggca gcaGCAGTTC GTCTGCGTCA
W I G K P L P T T G D D D L L R L

030-4
030-3

ATCGGGTTGT TGAACCAATG ATTGTCAATA ACCTTTGCAG TCAGCAGCGG 500
TAGCCCAACA ACTTGATTAC TAACAGTTAT TGGAAACGTC AGTCGTCGCC
I P N N F W H N D I V K A T L L P

ACTCAGTTCT CTCGCGATCG TCAGCTTTC GACGCCGGA AAGCCCAACA 550
TGAGTCAAGA GAGCCTAGC AGTCGAAAGG CTGCGGCCCT TTCGGGTTGT
S L E R A I T L K G V G P F G L

GGAGAAATGAA TAGCTTCATC GGTCTGTCTT CCCTATTAC TGCTGACTTC 600
CCTTCTACTT ATCGAAGTAG CCAGACAGAA GGGATAAGTG ACGACTGAAG
L L I F L K M


← ORF 1

Figura 11 (principio)

Secuencia nucleotídica de las 1880 bases obtenidas. En letras remarcadas se muestran los ORFs, indicando su nombre y dirección. Con letras minúsculas se muestran los cebadores empleados para la secuenciación.

	<i>Sal I</i>			
TCGAACCTCG	CAGTCACTGC	A <u>GTCGAC</u> GAT TAAGAGGCCG TGCCCGATT	650	
AGCTTGAGGC	GTCAGTGACG	T <u>CAGCTG</u> CTA ATTCTCCGGC ACGGGCTAAA		
GGTCGGTGCA	CAAGATCATA	AGAAGAAGCG CGGTTTTGAA AAGCCGTCGC	700	
CCAGCCACGT	GTTCTAGTAT	TCTTCTTCGC GCCAAAACCT TTCGGCAGCG		
TTCCTTGGT	TGCCTCAAAG	GGTTCGTCAA ATGTCTGCCA TGTCGGTAA	750	
AAGGAAACCA	ACGGAGTTTC	CCAAGCAGTT TACAGACGGT ACGGCCATTG		
		M S A M S V T		
		ORF 2		
CGCCTTGCCG	CCGGCATCGC	CGCCCAGCAT CAGCCGCTCA CCAGCGTTGT	800	
GCGGAACGGC	GGCCGTAGCG	GCGGGTCGTA GTCGGCGagt ggtcgcaaca		
A L P	P A S P	P S I	S R S	P A L S
			← 030-up	
CCGAAATGCC	TGACCACGGC	GTCATCTCA AAGGTGGCAT CGAAGCGGAT	850	
ggctttACGG	ACTGGTGCCG	CAGTAGAAGT TTCCACCGTA GCTTCGCCTA		
E M P	D H G	V I F K	G G I E A D	
TTTCTGAGT	TCAGTGCGGG	CAGACGGGAG TGGTGATGCC GGCTGAGCGG	900	
AAAGAACTCA	AGTCACGCCC	GTCTGCCCTC ACCACTACGG CCGACTCGCC		
F L E F	S A G	R R E W	*	
CAGGAGGCTT	CCGGTGGGGT	TGGGGCTAAC GCTTTGATTT GTTCAGCTTT	950	
GTCTCCGAA	GGCCACCCCA	ACCCCGATTG CGAAACTAAA CAAGTCGAAA		
GATATCGAAA	TTGAAGTGAT	GTACCGTGT AGTTCCTTTA CTTCTCCGCC	1000	
CTATAGCTTT	AACTTCACTA	CAATGCCAAA TCAAGGAAAT GAAGAGGCCG		
		M L R F S S F T S P P		
		ORF 3		
CTTCTCACGA	GATGCAGTCG	CTGTACATT TGTGTGGGGC GACGAGGAAC	1050	
GAAGAGTGCT	CTACGTACAGC	GACAGTGTA ACACACCCCG CTGCTCCTTG		
F S R	D A V A	V T F	V W G D E E L	
			030-do	
TCTCCCATGG	ATTGATGAGT	GGCggctgct gccaaagagt gtcGGAGATA	1100	
AGAGGGTACC	TAAGTACTCA	CCGCCGACGA CGGTTTCTCA ACGCCTCTAT		
S H G	L M S	G G C C	Q R V S E I	
			↓ Tn5-mob	
TCGACCGTTG	CTCAGGAGAG	CAGCGAGCGC GCCGAGGTTG ATTGAATGCC	1150	
AGCTGGCAAC	GAGTCCTCTC	GTCGCTCGCG CGGCTCCAAC TAAGTACCG		
S T V A	Q E S	S E R A E V D	* M P	
			ORF 4	
AGGAGCGCG	CTGCGCGGTG	TCCTTCGAGG CTTGCGCCCG TGCGCCTCGG	1200	
TCCTCGCCGC	GACGCCGCAC	AGGAAGCTCC GAAGCGGGC ACGCGGAGCC		
G A A	L R R V	L R G	F G P C A S D	

Figura 11 (continuación). Las bases subrayadas son 527 pb de ADN silvestre clonado en el plásmido pSK-030 (pSK-030 se utilizó como sonda para detectar el fragmento *EcoRI* de 5 kb en un banco de cósmidos de *R. etli*). Con una flecha vertical se señala la inserción del Tn5-*mob* en el fragmento *EcoRI*, que ocurrió entre los nucleótidos 1148 y 1149, alterando la secuencia del ORF 4.

ATGGGGGATG TTGGGGGATG CCGCGCCTTG GACGGCTTGA TAGGGCCGTA 1250
 TACCCcctac aaccctctac ggcgcgGAAC CTGCCGAAct ATCCCGGCAT
 G G C W G M P R L G R L D R A V
 ←
 ORF 5  M I L R G G S K A F Q
 GTCGAGGCGG GCGCCGAATG ATTTTGC GCGG GAGGCTCGAA GGCGTTCAG 1300
 CAGCTCCGCC CGCGGCTTAC TAAAACGCGC CTCCGAGCTT CCGCAAGGTG
 V E A G A E *
 V A R R P R E P H P E V P P K G P
 GTTGC GCGAC GCCAAGAGA GCCTCACCT GAGGTGCCTC CTAAGGGGCC 1350
 CAACGCGCTG CGGTTCTCT CGGAGTGGGA CTCCACGGAG GATTCCCCGG

 A G G A G A Q V S D D K Q R C C R
 TCGAGGCGGG GCAGGTGCGC AGGTGT CAGA TGACAAGCAG CGGTGTTCG 1400
 AGTCCGCCCG CGTCCACGCG TCCACAGTCT ACTGTTCGTC GCCACAACGG

 T L R T G C R G G A A R V P H G
 GCACGCTCCG CACGGGCTGC CGAGGAGGAG CCGCCCGCGT GCCGCACGGC 1450
 CGTGCGAGGC GTGCCCGACG GTCCTCCTC GCGGGGCGCA CGGCGTGCCG

 H Q G R *
 CACCAAGGCC GCTAGCCGTT GCCGTGCTCC TTGTCCGAG CCGTGCCGA 1500
 GTGGTTCGGG CGATCGGCAA CGGCACGAGG AACAGGCGTC GGCGACGGCT
 * G N G H E K D A A A A S

 AACAGCCCG CGTTGCGCGT GCTTCATCCC ATCGGGAAGC TGAAGCCAAT 1550
 TTGGTCGGGC GCAACGCGCA CGAAGTAGGG TAGCCCTCCG ACTTCGGTTA
 V L G R Q A H K M G D P L Q L W

 CATGCCTAGA CTCCTCGTAG ACGGACACCA GTGGCGGTGG AAATGCCGGG 1600
 GTACGGATCT GAGGAGCATC TGCCTGTGGT CACCGCCACC TTTACGGCCC
 D H R S E E Y V S V L P P P F A P

 TCGCGAAGG CGCCACGGC GACCCCGCAG AGGTCCGGAT TGAAGTCGCC 1650
 AGCCGCTTCC GCGGCTGCCG CTGCGGcgtc tccagcccta acttcagCGG
 D A F A G V A V G C L D P N F D G
 ←
 030-1
 CTCCAATAC ACGGACGTGC CGCAGTTCGG GCAGAAGTGG AAACGCACCT 1700
 GAGGGTTATG TGCCTGCACG GCGTCAAGCC CGTCTTACC TTTGCGTGG
 E W Y V S T G C N P C F H F R V

 TGCGCCCTTG CGCGGCTCC CGCTCGAAGG CTCTGCGATC TCCTCGATC 1750
 ACGCGGGAAC GCGCCG CAGG GCGAGCTTCC GAGACGCTAG AGGGAGCTAG
 K R G Q A A D R E F A R R D G E I

 G T C A C T T C G C C T T C G C G A A G A T C G C A C C G C T T C C G G C C A 1800
 C A G T G A A G C G G A A G C G C T T C T A G C G T G G C G A A G G C C G G T G C C G G C C A
 T V E G K A F I A G S G A V A G T

 T C T G C G C T G A C A A T C G C G C A G T G G C A G A T G C T C A C C G T G A G C G G A T C G C 1850
 A G A C G C G A C T G T T A G C G C C G T C A C C G T C T A C G A G T G G C A C T C G C C T A G C G
 R R Q C D R C H C I S V T L P D


 C T G A T G T C T T T G C G C G G A G T G A T C C G C A A T 1880
 G A C T A C A G A A A C G C G C C T C A C T A G G C G T T A
 G S T K A R L S G C  ORF 6 (truncado)

Figura 11 (conclusión)

Análisis de la secuencia

La secuencia obtenida contiene seis marcos abiertos de lectura (ORFs) (figura 12).

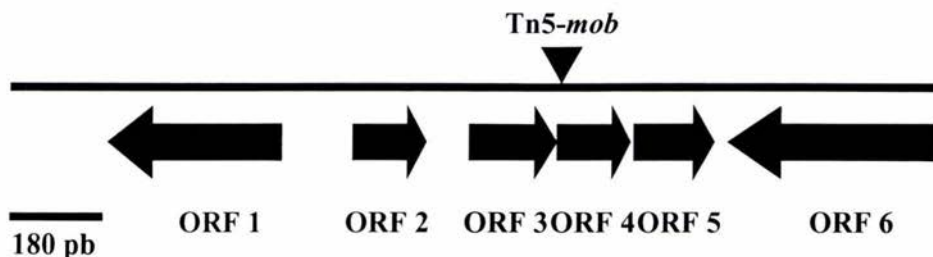


Figura 12.

Se muestra la región secuenciada de 1.8 kb, donde se indican los seis marcos de lectura encontrados. Los ORFs 1/6 presentan homologías con proteínas presentes en los bancos de datos, que se comentarán más adelante. Los ORFs 2/3/4/5 no presentan homología con ningún gene reportado hasta ahora, por lo que se trataría de nuevos genes. La inserción del *Tn5-mob* ocurrió al inicio del ORF 4.

En la tabla 9 se resumen los datos más importantes de cada ORF.

Tabla 9. Datos principales de los ORFs.

ORF	Secuencia nucleotídica (pb)	Traducción del ORF	Homologías encontradas en el GenBank	Observaciones
1	569 a 147 (3' → 5')	140 aa	Homología con un segmento de 140 aa de una proteína hipotética de <i>Deinococcus radiodurans</i> (Homología 49%) (Identidad 32%) Homología con GTPasas de diferentes organismos (Homología 60 a 82%) (Identidad 33 a 65%)	En esta secuencia se reconoce el motivo Walker A [GXXXXGK] del dominio asa-P (<i>P-loop</i>), lo cual permite reconocer a la proteína dentro de la familia de las GTPasas
2	731 a 886 (5' → 3')	51 aa	Ninguna	Posiblemente se trate de un gene único
3	969 a 1145 (5' → 3')	58 aa	Ninguna	Posiblemente parte de un operón
4	1146 a 1271 (5' → 3')	41 aa	Ninguna	Posiblemente parte de un operón ORF interrumpido por el Tn5- <i>mob</i> La inserción ocurrió al principio del ORF (entre las bases 3 y 4)
5	1268 a 1465 (5' → 3')	75 aa	Ninguna	Posiblemente parte de un operón
6	1878 a 1462 (3' → 5')	138 aa	Homología con una proteína hipotética conservada en varios microorganismos (Homología 26 a 47%) (Identidad 41 a 64%)	ORF incompleto No se conoce el principio

ORF 1

El ORF 1 presenta homología con una proteína hipotética de *Deinococcus radiodurans* (figura 13) y con proteínas de 4 microorganismos diferentes (figura 14). Todas las proteínas presentan una secuencia conservada, homóloga al motivo Walker A del dominio asa-P (*P-loop*) [GXXXXGK] (Walker *et al.*, 1982). Se sabe que en este dominio se lleva a cabo la unión de nucleótidos fosfatados en las NTPasas correspondientes, lo cual permite clasificar a estas proteínas dentro de ciertas familias, como la familia de GTPasas o la familia de GHMPasas (Leipe *et al.*, 2002). Dos de las proteínas homólogas son NTPasas funcionales: una ATPasa de *Bacillus cereus* y una shikimato cinasa de *Clostridium perfringens*.


```

Re 1 MKLFILLGFPVGVKLTIARELSPLLAKVIDNHWFNPNILRLDDDDGTTPLPKGIWEYIGRVRQ 65
    M L+G PG GK T+ EL+ L A ++DNH N+P+ G P +W + R+R
Dr 1 MSRLFYLIGPPGSGKRTVGLLELTRLTGAALLDNHI INDPMFAAFGFTGQGDPPAEVVSFTRRLRA 65

Re 66 AVLDAIVAYGPPSANFISTH-AGIEGDESNRTFQQIAGAARECEALLVPVRLLCDEEELARRVA 129
    +L+A+ A ++ + + A + G+ + A A + A VPV L C EEL RR+
Dr 66 LLEAVAAAPAGVSHIFITNYLADLPGEA---EMIGKFAALAEQRGATFVPVFLTCPEELRRRMP 127

Re 130 TPARRDRLKVD 140
    P RR RLK+
Dr 128 LPERRARLKLTDPTLQAVLDSKGVLPVPEGMLTLDTSRLSPEEAARAIMGHAEALALSSSNPH 192

```

Figura 13.

Alineamiento entre el ORF 1 de *Rhizobium etli* (Re) y un fragmento de 140 aa de una proteína hipotética de 192 aa (número de acceso: AE002043_11) de *Deinococcus radiodurans* (Dr) (Homología 49%, Identidad 32%). En letras resaltadas se indican los aminoácidos que forman el motivo Walker A del asa-P, dominio involucrado en la unión de nucleótidos fosfatados.

```

Re 1 MKLFILLGFPVGVKLTIARELSPLLAKVIDNHWFNPNILRLDDDDG 48
Ba 3 FLQMSGFPVGSKSTVSKYIGELTGAIIVDHDVLKSALLRSLEVKG 47
Bc 3 FLQMSGFPVGSKSTVSKYIAKLTGAVIIDHDVLKSALLKSLKVKG 47
Cp 6 VLLIGMPGAGKTTIGRELSKVLKMNFLD 33
Os 126 ILLLGKPGVGKTTIIREIARVLS 148
Consenso G PG GK T

```

Figura 14.

Alineamiento entre el ORF 1 de *R. etli* y las proteínas homólogas encontradas. En todas las proteínas está conservado el motivo Walker A del asa P (consenso).

- Re: Segmento de 48 aa localizado en el ORF 1 de *Rhizobium etli* CFN030
- Ba: Segmento de 45 aa, proteína hipotética (174 aa) de *Bacillus anthracis*
Número de acceso: NP_654666 (Homología 60%, Identidad 33%)
- Bc: Segmento de 45 aa, ATPasa de *Bacillus cereus* (174 aa)
Número de acceso: AAP07726 (Homología 60%, Identidad 33%)
- Cp: Segmento de 28 aa, shikimato cinasa *aroK* de *Clostridium perfringens* (171 aa)
Número de acceso: BAB80407 (Homología 67%, Identidad 53%)
- Os: Segmento de 23 aa del ORF-455 de *Odontella sinensis*
Número de acceso: CAA91669 (Homología 82%, Identidad 65%)

ORF 2

Este ORF codifica para una proteína de 51 aa:

MSAMSVTALPPASPSPSISRSPALSEMPDHGVIKGGIEADFLFESAGREW*

Probablemente se trate de un gene único, que no forma parte de operón alguno.

ORF 3 / ORF 4 / ORF 5

El ORF 3 codifica para una proteína de 58 aa:

MLRFSSFTSPPFSDAVAVTFVWGDEELSHGLMSGCCQRVSEISTVAQESSERAQVD*

El ORF 4 codifica para una proteína de 41 aa:

MPGAALRRVLRGFGPCASDGGCWGMPRLGRLDRAVVEAGAE*

El ORF 5 codifica para una proteína de 75 aa:

MILRGGSKAFQVARRPREPHPEVPPKGPAGGAGAQVSDDKQRCRRTLRTGCRGGAARVPHGHQGR*

Aunque el tamaño de cada proteína predicha es pequeño, probablemente estos tres ORFs formen un operón, dado que el codón de paro TGA del ORF 3 (*) está seguido por el codón de inicio ATG del ORF 4 (metionina), sin que medie base alguna; y se observa un traslape entre el codón GAA del último aminoácido del ORF 4 (ácido aspártico) y el codón de inicio ATG del ORF 5 (metionina).

El ORF 4 es el ORF de mayor importancia, dado que la inserción del Tn5-*mob* ocurrió al inicio de este ORF, entre la metionina y la prolina. Es posible que el Tn5 haya afectado la expresión del ORF 4 y del ORF 5.

No se encontró homología alguna de los ORFs 3/4/5 ni del ORF 2 con genes y proteínas de la base de datos GenBank, por lo que en caso de existir, serían genes nuevos.

ORF 6

Presenta homología con una proteína conservada en varios microorganismos (figura 15).

Re	-----CGSLRAKTSG-DPLTVSICHCRDCQRRRTGAVA
Ml	-----MVDARCSCGALTTLTLTG-PSMLVVACHCLDCQRRRTGAPF
Vp	-----MTNI IHTGECACGLVQLRCKD-EPLRTSICHCFECQKRTGVSF
Np	-----MI PYTGGCQCRQIRYEIHA-QPLTLYLCHCKECQKQSSAF
So	-----MQPIEFLEGGCLCGAIRYRIEG-NPFDADYCHCRMCQKSI GAAF
Mm	-----AWTACGLSGGCLCGALRYEARS-PPLRVTLCHCRFCQRTVGTSSH
Pa	-----MDRFTGGCLCGKVRVVASG-RPYRVGLCHCLDCRKHGHALF
Na	-----MLGETALMTYTGSCACGAVTLEISG-KTLGTRQCWCRCQQIAAGGP
Rs	MPSAVLRPACPCCTARSPGLSSVKRWGGDMQVTGGCRGCEVRFVARG-RPYRVGLCHCLDCRKHGHALF
Rp	-----MTGTG--KAVLSGGCQCGAIRYALSA-PPLSTALCHCRMCQKATGAPF
Cc	-----MSLSGGCQCGAVRFRVVG-EPGRASICNCRMCQKAFAGFP
Xa	-----MDTS--SEYSGGCQCGAVRFRVVG-ALVDASICHCRMCQKAFGAYY
Nc	-----MADADKGLPVSCECGYIKFQTPSSKPLGTACCHCTSCKKQASFF
Rr	-----MTESSDRAPRLTGGCQCGKVRVYALFA-DPQGVHLCHCRMCQRAVGGFP
Consenso	C CG CHC CQk ga
Re	GSGAIFAKGEVTIEGDRR---AFERDA-AQGRKVRFHFCPNCCTSVYWEGDFNPD---LCGVAVGAF
Ml	GVGAFYPADAVAI SGTAK---EFTRDA-ASGGKVHNYLCPACGSTVYWKADRLPS---MIGVAVGALT
Vp	GVQAKFDKEQVILDGDTT---NYTRIS-DDGNEVKYEFPCPACGTTMRLLLSTAPE---IVVVPVIGIFN
Np	GMSLTVLRDSVVI VQKPK--AWTRKN-DNGREVNNLFCGDCGTRLFHERTYKTD---TINVKAGTLD
So	GAWMDFNVSQVTWLKGNV---TEF---ASSDFVRRGFCAQCGLSLTYRHTEYPD---YLTLTIA SFD
Mm	LVEPLFDRDDLRTVTSQGP A---TYRHRSESGSKPVDLHFCATCGTMLFMTFERFPG---LCGVSAGTLD
Pa	HASAI FPAAVSI EG---ETRDYAGRFPCPQCGSSVFSRSAD E---IEVSLGALD
Na	TNNAIFRAEDVRIDGELS---TGEWPA-ASGNLTTFSPCPSCGAQIFAQSSARKH---LVTVRIGVID
Rs	HASAI FPASAVSVEG---TPSDYKGRAPFCPRCGSQLFRSEDE---IEINLGALD
Rp	ASMAEVAKDNFAWTRGQP---ASF---RSSVAERDFCKDCGTPLGYRLMFC D---SIEILTGTFD
Cc	GALVTVEVGLDWTWRGAP---THF---QSSDQIKRGFCAACGTPPLTFEWSDSK---IDLAVFAFD
Xa	APLVSVRGTEFRWRGEP---KRF---ASSTVVQRGFCADCGTPLTYEAPDG---ISVAAGAFD
Nc	GTSVYFPPTSQMPPLPADLESKLSIFTHPTESGNTMHCYFCPKCGVRFVHAGVLPDGNMRPVVAIKGGVIE
Rr	AALAPVRVDEFAWTSGRP---AFY---PSSNLAERGFCDRCGTPLSFRYLTDG---WIDVTLGSLD
Consenso	v FC CG l v l
Re	D-PA--FPPP---LVSVEESRHDWLQLPDGMKHAQRGLVSA AAAADKEHGNG-----
Ml	D-PK--YPPP---VKSIFEQSKHDVWQIDGAVDHFROGSGAGKSS-----
Vp	N-TE--FHEP---KVSIEYEQRKHGWSFECTMEHIQ-----
Np	D-TS--WLQP---VGNIWTRSAQSWVIISDQLLNVDGQPEDTQPLWEKWKQQHP-----
So	D-PN--LVQP---NYHIYTEQQLSWLKI EDNCQRYQPQARTK-----
Mm	D-PACIEVRPD---NAKQVFVASARPDVLLPLGLNTFAGPAIRRGRPPAPAACA-----
Pa	A-PD--RFQP---TYELWTVRREGWLPAPFLARHYERDRREGD---RSEE-----
Na	T-PN--DLRP---EMAIWTEEAPAWAQIDPRLENYPRQPPPPQAKA-----
Rs	A-PD--LFRP---TYELWTVRREGWLPAPFLARHYERDRPTAG---RHEE-----
Rp	R-PD--RVVP---TMQYGTPEARLGWTGTIANLPSKTTLQN-YGPDRLAQVFSYQ---QPDHD-----
Cc	D-PS--TVEP---GVQLAVEGRPAWMDHLAQMPVRPMPGPG---AVTSRQ---HPDHD-----
Xa	T-PE--RLPP---HIQYGLDRKLFPVDSLALPTRPPEDDAAAEFLASVVS RQ---HPDHDTAHWA
Nc	SGLDWEKMKPKHIYTRSAVMELPEEWECYETTAPAQYGPAPGDAAKGETKKE-----
Rr	T-PD--RVAP---VENFVGVESRLSWLDRVVDLPGHETGDYGGPETLAGLASNAQAVPRPSDDE-----
Consenso	P W

Figura 15.

Alineamiento de secuencia de proteínas entre el ORF 6 de *R. etli* y las proteínas homólogas encontradas. En letras remarcadas se muestra el consenso de las secuencias de aminoácidos: en mayúsculas corresponden las proteínas conservadas en casi todos los microorganismos, y en minúsculas las proteínas conservadas en varios de ellos.

Cabe destacar que estas proteínas presentan una serie de cisteínas muy conservadas, distribuidas filogenéticamente en bacterias, en una cianobacteria y en un eucarionte (véase la tabla 10 para una mejor explicación). El ORF 6 está truncado, no se conoce el principio de la secuencia.

Tabla 10.

Características importantes de las proteínas conservadas en otros microorganismos que presentan homología con el ORF 6.

Inicial	Microorganismo	Clasificación Taxonómica	Tamaño	Homología	Identidad	Número de acceso
Ml	<i>Mesorhizobium loti</i>	α -proteobacteria <i>Rhizobiaceae</i>	138 aa	59/124 47%	80/124 64%	BAB48938
Vp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	γ -proteobacteria	133 aa	47/122 38%	72/122 59%	BAC61858
Np	<i>Nostoc punctiforme</i>	Cianobacteria	150 aa	33/117 28%	61/117 52%	ZP_00111753
So	<i>Shewanella oneidensis</i>	γ -proteobacteria	136 aa	38/117 32%	57/117 48%	AAN53959
Mm	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	α -proteobacteria	156 aa	36/97 (37%)	52/97 (53%)	ZP_00048968
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ -proteobacteria	130 aa	42/123 (34%)	61/123 (49%)	AAG06110
Na	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	α -proteobacteria	147 aa	35/123 (28%)	57/123 (46%)	ZP_00094944
Rs	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	α -proteobacteria	159 aa	33/112 (29%)	52/112 (46%)	ZP_00006649
Rp	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	α -proteobacteria <i>Rhizobiaceae</i>	154 aa	35/119 (31%)	51/119 (45%)	ZP_00011412
Cc	<i>Caulobacter crescentus</i>	α -proteobacteria	143 aa	36/113 (31%)	53/113 (46%)	AAK25645
Xa	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Citri</i>	γ -proteobacteria	157 aa	35/111 (33%)	47/111 (45%)	AAM36436
Nc	<i>Neurospora crassa</i>	Eucarionte <i>Fungi</i>	168 aa	22/83 (26%)	38/83 (45%)	EAA33327
Rr	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	α -proteobacteria <i>Rhizobiaceae</i>	161 aa	36/115 (31%)	48/115 (41%)	ZP_00015728

Complementación genética

La cepa CFN030 fue aislada por presentar un fenotipo resistente a azida de sodio (Az^R). El análisis de la secuencia obtenida revela que el Tn5-*mob* afectó la expresión de un gene.

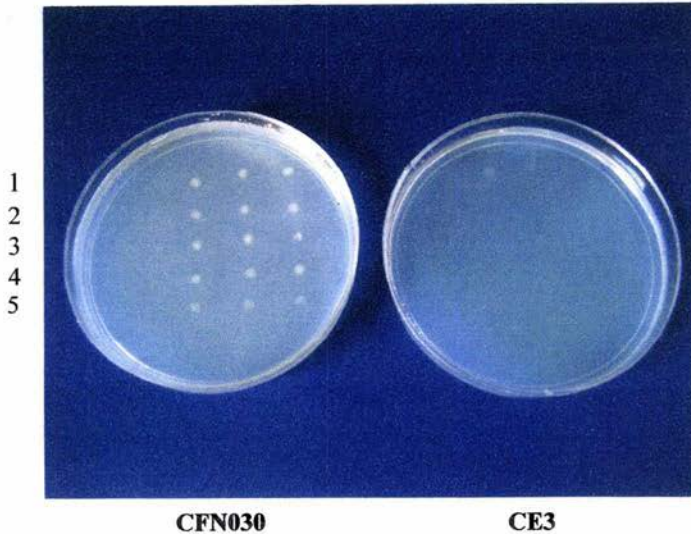
Se realizó un experimento de complementación genética con la finalidad de demostrar que el inserto del plásmido pFV contiene el gene silvestre que fue mutado por el Tn5-*mob* en la cepa CFN030. Al realizar este experimento, se esperaba que la introducción de un plásmido con dicho gene silvestre en la cepa CFN030 permitiera la expresión de la proteína alterada, lo cual se traduciría en restaurar el fenotipo silvestre; esto significa que la cepa complementada exhibiría un fenotipo sensible a azida de sodio (Az^S) como lo hace la cepa CE3.

La complementación genética fue negativa. Los resultados se resumen en la tabla 11, y en la siguiente página puede observarse el crecimiento de las colonias en caja Petri.

Tabla 11. Resultados de la complementación genética. En medio mínimo se sembraron las seis cepas correspondientes, en ausencia y presencia de azida de sodio. El crecimiento observado va de nulo (-) a excelente (+++).

Cepa de <i>Rhizobium etli</i>	Az^0	Az^{10}	Az^{12}
CE3 (silvestre)	+++	-	-
CFN030 (mutante)	+++	+++	+++
CE3 / pRK7813	+	-	-
CFN030 / pRK7813	-	+++	+++
CE3 / pFVRK		-	-
CFN030 / pFVRK		+++	+++

No se observó restauración del fenotipo silvestre, ya que el fenotipo Az^R de la cepa CFN030 es dominante aún en las cepas que contienen el plásmido pFVRK. La cepa CE3 expresa su fenotipo Az^S todo el tiempo, como es de esperarse. Posiblemente el fenotipo Az^R de la cepa CFN030 se deba a la expresión constitutiva de un gene; esto se abordará en la discusión.



Complementación genética de la cepa mutante CFN030

1. Cepas CFN030 y CE3
2. Cepas CFN030/pRK7813 y CE3/pRK7813
3. Cepas CFN030/pFVRK y CE3/pFVRK
4. Cepas CFN030/pFVRK y CE3/pFVRK
5. Cepas CFN030/pFVRK y CE3/pFVRK

Condiciones de cultivo: MM - AzNa 10 µg/mL / 48 hr / 30°C

La cepa CFN030 con los plásmidos pFVRK (complemento) y pRK7813 (vector) tiene una resistencia a azida de sodio similar a la de la cepa CFN030 sin plásmidos, lo que demuestra que el fenotipo mutante es dominante aún en presencia del complemento. La cepa CE3 con los plásmidos pFVRK y pRK7813 es tan sensible a azida de sodio como la cepa CE3 sin plásmidos, por lo que se descarta que la dominancia del fenotipo mutante se deba a la presencia del vector pRK7813 en el genoma de *Rhizobium etli*.

DISCUSIÓN

La cepa CFN030 de *Rhizobium etli*, cuya caracterización molecular es el tema de esta tesis, fue obtenida mediante mutagénesis de la cepa CE3 con el transposón Tn5-*mob* y seleccionada por su fenotipo resistente a azida de sodio (Az^R). Se decidió seleccionarla de esta manera con base en el razonamiento de que, si se aislaban mutantes de *R. etli* con una expresión incrementada de las oxidasas terminales, dichas mutantes podrían presentar una mayor fijación de nitrógeno (Miranda *et al.*, 1996). La obtención de la cepa CFN030 y la demostración de que su fenotipo Az^R se debe a la inserción del Tn5-*mob*, fueron realizadas por Jorge Membrillo Hernández como parte de su tesis profesional (Membrillo, 1991).

La cepa CFN030 se caracterizó bioquímicamente mediante estudios de espectroscopía y ensayos de actividad reductora de acetileno (ARA). Presenta actividades respiratorias aumentadas en cultivos microaeróbicos, expresión deprimida del citocromo aa₃ (oxidasa terminal de vida libre), y expresión de la oxidasa terminal cbb₃ en la fase post-exponencial del crecimiento, que no se expresa en la cepa silvestre, excepto durante la simbiosis. Las plantas inoculadas con la cepa mutante comienzan a fijar nitrógeno dos días antes que las plantas inoculadas con la cepa silvestre; también presentan un incremento de 20% en el contenido total de nitrógeno (Miranda *et al.*, 1996).

Previamente se estudió la transcripción del operón *fixNOQP* en la cepa CFN030, encontrándose que los niveles de transcripción son similares a los de la cepa silvestre, por lo que se concluye que no está afectada en la expresión de estos genes. Al no estar afectada la regulación de *fixNOQP* también se descartan alteraciones en los genes *fixL*, *fixJ* y *fixK*. De igual modo, se descartan alteraciones del sistema *fnr* pues la cepa CFN030 es capaz de crecer empleando nitrato como aceptor de electrones. Sin embargo, dado que se detectó una señal del citocromo cbb₃ durante la fase estacionaria del crecimiento, es posible que esta cepa pudiera presentar una alteración en la biogénesis de los citocromos tipo c (Miranda, 1995).

Mediante una hibridación tipo Southern se determinó que la bacteria sufrió la inserción del transposón Tn5-*mob* en un fragmento *EcoRI* de 5 kb perteneciente al cromosoma (Miranda *et al.*, 1996).

Para saber con exactitud cuál es el gene o conjunto de genes mutado en la cepa CFN030, fue clonado el fragmento de tipo silvestre afectado por el Tn5-*mob*, con el fin de obtener la secuencia nucleotídica de la región y compararla con los bancos de genes. Este trabajo de clonación e identificación ha sido el tema central de esta tesis, y se discutirá a continuación.

Se clonó un fragmento *EcoRI* que contiene la zona de ADN adyacente a la inserción del Tn5-*mob*. Este fragmento *EcoRI* tiene un tamaño de 5 kb, y se obtuvo la secuencia nucleotídica de 1880 pb. Esta secuencia contiene 6 ORFs.

El ORF 1 presenta el motivo Walker A, [GA]XXXXGK[ST] (Walker *et al.*, 1982). Este motivo ha sido identificado como parte de la estructura primaria del asa-P (*P-loop*), un dominio capaz de unir nucleótidos trifosfatados (NTP). La existencia del motivo Walker A sugiere que el ORF 1 podría codificar una proteína perteneciente a la familia de NTPasas descrita por Leipe y colaboradores (Leipe *et al.*, 2002). La función del motivo Walker A es posicionar adecuadamente la parte del trifosfato del nucleótido que se une. Varias proteínas que unen ATP o GTP presentan el asa P (dominio donde se lleva a cabo la unión de grupos fosfato), cuya estructura primaria consiste en una secuencia rica en glicina, seguida de una lisina conservada, y una serina o treonina. Esta familia incluye muchas proteínas, como cinasas de nucleótidos y diversos metabolitos, ATPsintetasas, ATPasas dependientes de ácidos nucleicos como helicasas, transportadores ABC, productos oncogénicos, factores de elongación y de traducción, proteínas G y miosina (Saraste *et al.*, 1990; Krell *et al.*, 1998; Leipe *et al.*, 2002). En todos los casos hay un residuo conservado de lisina [K], probablemente muy importante para la conformación canónica del asa-P. Este residuo puede interactuar directamente con los β - y γ -fosfatos del ATP unido. La amplia distribución del motivo Walker A en estas proteínas sugiere que fue un patrón antiguo en la evolución molecular (Milner-White *et al.*, 1991), aunque no existe un patrón universal de asa-P en las proteínas que unen ATP o GTP (Saraste *et al.*, 1990). Se sabe que algunas de estas moléculas pertenecen a la superfamilia de GHMP cinasas, cuyos miembros participan en procesos como el metabolismo de aminoácidos, galactosa o mevalonato (un precursor del colesterol) (Gu *et al.*, 2002), y en procesos de diferenciación celular de eucariontes como *Caenorhabditis elegans* (Luz *et al.*, 2003).

El ORF 1 tiene homología con dos GTPasas funcionales de otros microorganismos (una shikimato cinasa de *Clostridium perfringens* y una proteína que une ATP de *Bacillus cereus*) y tres proteínas hipotéticas de otros microorganismos, siendo la de mayor similitud una proteína hipotética de *D. radiodurans*. Llama la atención que en todos los casos, la secuencia incluye una prolina y una glicina conservadas [G_PG_GK_T]. La shikimato cinasa es una enzima involucrada en la biosíntesis del corismato, un precursor de compuestos aromáticos diversos a partir de eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato como aminoácidos aromáticos, ácido *p*-aminobenzoico, folatos y quinonas. La biosíntesis de corismato es esencial en bacterias, algas, hongos y plantas superiores (Krell *et al.*, 1998; Daugherty *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002).

Nuestra secuencia [GFPGVGKLT] es muy parecida tanto a la shikimato cinasa de *C. perfringens* [GMPGAGKTT] como a la familia de adenilato cinasas [GXPGXGKGT] (Saraste *et al.*, 1990). Existe una divergencia entre la leucina posterior a la glicina de nuestra secuencia, y el aminoácido posterior a la glicina de otras secuencias (treonina en la shikimato cinasa, glicina en las adenilato cinasas, serina en las otras proteínas hipotéticas identificadas). Saraste y colaboradores mencionan que el residuo de glicina subsecuente a la lisina permite distinguir las adenilato cinasas de otras proteínas con el dominio asa-P, lo que me induce a especular que este residuo de leucina podría corresponder a la secuencia de una nueva NTPasa. Sin embargo, haría falta evidencia experimental para demostrar la existencia de esta NTPasa funcional, así como para determinar a qué clase pertenece. No parece viable que la inserción del Tn5-*mob* haya afectado la expresión del ORF 1, pero en caso de hacerlo, podría alterar una vía metabólica muy importante como el metabolismo de aminoácidos, de azúcares, o inclusive un componente de la cadena respiratoria como las quinonas.

El ORF 6 presenta homologías con un gran número de proteínas hipotéticas de muchos microorganismos (varias proteobacterias de las clases α y γ , una cianobacteria y un hongo). Todas estas proteínas muestran siete residuos de cisteína conservados, excepto el ORF 6 de *Rhizobium etli*, que contiene seis residuos de cisteína (4%). No es común en la naturaleza encontrar tantos residuos conservados de cisteína, por lo que probablemente estas proteínas pertenecen a una familia que aún no ha sido caracterizada (J. Miranda, *com. pers.*). No pueden elaborarse más hipótesis al respecto.

El ORF 2 podría tratarse de un gene único, mientras que los ORFs 3/4/5 probablemente formen un operón. Sin embargo, los cuatro ORFs son de tamaño pequeño, por lo que podrían no existir. El ORF principal es el ORF 4, donde se localizó la inserción del Tn5-*mob*. Los ORFs 3/4/5 (y el ORF 2) carecen de homología con las bases de datos GenBank y RhizoBase, incluyendo los genomas de *B. japonicum*, *M. loti* y *S. meliloti*. Con el objeto de poder conocer su función, convendría realizar estudios de mutagénesis individual de cada ORF para saber cuál(es) es(son) responsable(s) del fenotipo Az^R.

Se hizo un estudio de complementación genética, que consistió en la introducción de un plásmido en la cepa mutante con el fragmento de tipo silvestre que fue mutado, esperando observar la restauración del fenotipo silvestre (Az^S). El resultado de la complementación fue negativo, predominando el fenotipo Az^R aún en presencia del fragmento clonado. Este fenotipo dominante podría deberse a la expresión constitutiva del ORF 5.

Recordando que las mutaciones inducidas por Tn5-*mob* pueden presentar polaridad, se plantean algunas hipótesis para explicar los resultados obtenidos. Supongamos que los ORFs 3/4/5 forman un operón.

Si la mutación no es polar, la inserción del transposón sólo afectaría la expresión del ORF 4, por lo que al expresarse este gene nuevamente mediante un plásmido introducido en la cepa mutante, se formaría la proteína afectada por la mutación, observando el fenotipo silvestre (Az^S). Esto no sucede.

Si la mutación es polar, se afecta la expresión de los ORFs 4/5. Al introducir un plásmido que expresa nuevamente estos genes, se restablece la expresión de las proteínas correspondientes, por lo que se observaría un fenotipo silvestre. Esto tampoco ocurre.

Sin embargo, es posible una tercera hipótesis: que el Tn5-*mob* provoque la expresión constitutiva de uno o varios genes situados río abajo del ORF 4, lo cual es consistente con estudios que muestran que el Tn5 posee un promotor que puede oscurecer los efectos polares en genes río abajo (Berg *et al.*, 1980; Clark *et al.*, 1994). Este fenómeno se ha observado en otras mutantes de *R. etli* con Tn5-*mob* (Miranda *et al.*, 1996; Tabche *et al.*, 1998). La expresión constitutiva de tal gene podría tener un efecto pleiotrópico que repercute en la respiración y/o en la FSN. Esta hipótesis es la más razonable para explicar la ausencia de complementación genética.

Debe aclararse que el aumento en la FSN puede no estar relacionado directamente con un metabolismo aeróbico incrementado por parte de la bacteria. Posteriormente se mencionarán algunos ejemplos de mutaciones en genes de diferente naturaleza que conducen a alteraciones de la fijación de nitrógeno y/o de la respiración. Aunque se hayan caracterizado los espectros de la cepa CFN030, no puede concluirse que el aumento en la fijación de nitrógeno se deba a la expresión de las oxidasas observadas (*cbb₃* y *aa₃*), pues ya se mencionó en la introducción que otras oxidasas terminales también están relacionadas con la simbiosis, como la quinol oxidasa *bd* y la quinol oxidasa *bb₃*.

Aún cuando la cepa CFN030 exprese la oxidasa simbiótica *cbb₃* en la fase post-exponencial del crecimiento, no se concluye que la mutación haya afectado la expresión del operón estructural *fixNOQP*, dado que tanto la mutante como la silvestre presentan niveles de expresión similares.

Es posible que la resistencia a azida de sodio esté vinculada con el citocromo *bd* (Barquera *et al.*, 1991a; Sharma *et al.*, 1997). El aumento en la FSN podría deberse a una mejor infección inicial de los nódulos gracias a la mayor eficiencia de este citocromo; no obstante, también es posible que el fenotipo simbiótico no esté ligado a la respiración bacteriana.

Otra explicación viable es que se haya alterado una vía metabólica (como la biosíntesis de un aminoácido o de un polisacárido) que incide de manera directa o indirecta en la nodulación, en la fijación simbiótica de nitrógeno o en la cadena respiratoria. En la literatura existen ejemplos al respecto, como mutantes auxótrofos de aminoácidos en *R. etli* que presentan alteraciones en su nodulación (Ferraioli *et al.*, 2002), mutantes deficientes en la síntesis de glucógeno y de poli- β -hidroxibutirato que presentan un fenotipo simbiótico mejorado (Marroquí *et al.*, 2001; Cevallos *et al.*, 1996; respectivamente), y una cepa mutante en la biosíntesis de purinas que muestra una relación entre el metabolismo de estas bases nitrogenadas y la FSN (Soberón *et al.*, 1999). No estaría de más estudiar la citología, histología y fisiología de los bacteroides formados por la cepa CFN030, para determinar si hay cambios en algún proceso metabólico como la síntesis de polisacáridos. Tampoco se descarta la hipótesis de que la mutación induzca efectos colaterales en el metabolismo de la planta, fenómeno observado en la cepa CFN037 (Silvente *et al.*, 2002). También es posible que la mutación haya afectado algún(os) gene(s) regulador(es) de la FSN, como *ntr* o *syr*, por ejemplo.

Algunos de los microorganismos que mostraron homologías con los ORFs 1/6 son conocidos por su patogenicidad (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahemolyticus*), por su utilidad en biorremediación (*Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*) o por ser resistentes a radiaciones (*Deinococcus radiodurans*, *Shewanella oneidensis*). Esto sugiere que los ORFs podrían estar relacionados con un proceso respiratorio (aerobio o anaerobio), o con otro proceso biológico como la interacción hospedero-huésped. Además, dos organismos eucariontes mostraron homologías: el alga *Odontella sinensis* y el hongo *Neurospora crassa*, por lo que el estudio de la cepa CFN030 también podría aportar conocimiento en evolución molecular.

Se sabe que en especies como *Azotobacter vinelandii* y *Clostridium pasteurianum*, la azida de sodio puede ser reducida a amoníaco y nitrógeno molecular por el complejo nitrogenasa (Hardy y Knight, 1967). El fenotipo Az^R puede funcionar como indicador de una mayor actividad enzimática por parte de la nitrogenasa, independientemente del papel de la azida como inhibidor de oxidasas terminales. Experimentalmente, se observó que las plantas inoculadas con la cepa CFN030 presentan mayor actividad reductora de acetileno (ARA) que las plantas inoculadas con la cepa silvestre (Miranda *et al.*, 1996).

El resultado negativo de la complementación induce a pensar que el Tn5-*mob* provocó la expresión constitutiva de cierto(s) gene(s) desconocido(s), lo que significa alteraciones en otras vías metabólicas que pueden conducir a un aumento en la fijación de nitrógeno. La infección de la planta por parte de la bacteria, la formación de nódulos en las raíces y la fijación simbiótica de nitrógeno efectuada por el bacteroide, son procesos relacionados con diversas funciones metabólicas, tanto en la bacteria (síntesis de polisacáridos, ciclo de los ácidos tricarbóxicos, cadena de transporte de electrones, fermentaciones, etc.) como en la planta (síntesis de flavonoides y nodulinas, metabolismo de aminoácidos, fotosíntesis, etc.). Podría tratarse de una vía metabólica cuya relación con la fijación de nitrógeno no es apreciable fácilmente, de manera análoga a otras cepas mutantes (Miranda-Ríos *et al.*, 1997; Soberón *et al.*, 1999).

Es necesario realizar más estudios de carácter genético y bioquímico, para elucidar las causas del fenotipo simbiótico incrementado en la cepa CFN030.

En la literatura se encuentra una cantidad enorme de bacterias mutadas que han sido afectadas en su FSN, y en otros procesos relacionados con ella. A continuación se presentan tres ejemplos de bacterias alteradas en su fenotipo simbiótico, cuya importancia se relaciona con nuestra investigación.

El primer ejemplo se encuentra en la publicación de cepas mutantes espontáneas de *Mesorhizobium loti*, que fueron aisladas por mostrar una resistencia incrementada a azida de sodio. Algunas de estas cepas mostraron incrementos en la actividad respiratoria y en la FSN. Las plantas de *Lotus pedunculatus* inoculadas con tres mutantes previamente seleccionadas, presentaron mayor número de nódulos (25 a 37%), mayor ARA (40%), mayor peso seco (13 a 21%) y mayor contenido total de nitrógeno (15 a 22%) en comparación con las plantas inoculadas con la cepa silvestre (Sharma *et al.*, 1997).

Entre estas mutantes destaca la cepa Az9, cuyo fenotipo es muy parecido al de la cepa CFN030: mayor actividad respiratoria bajo condiciones microaeróbicas (TMPD⁺⁺), ARA incrementada en la simbiosis, fenotipo simbiótico mejorado, y elevada resistencia a azida de sodio.

La cepa Az9 no ha sido caracterizada bioquímica ni molecularmente, lo que limita esta discusión. Ni siquiera se conoce su perfil de citocromos, y es imposible conocer el gene afectado por mutaciones espontáneas, a diferencia de las mutaciones hechas con Tn5-*mob*.

Los autores sugieren demostrar una asociación entre el fenotipo TMPD⁺⁺ y la expresión de *fixNOQP*. También mencionan que la cepa Az9 podría estar alterada en la expresión del citocromo tipo d por analogía con el citocromo d en *E. coli*, lo cual es razonable dado que el citocromo d en *E. coli* es resistente a azida de sodio, pero desconocen el papel de esta oxidasa terminal en las rizobiáceas y no explican relación alguna entre la FSN y el citocromo d.

Sería interesante hacer estudios bioquímicos y genéticos con la cepa Az9, para compararlos con la cepa CFN030. Un estudio interesante sería determinar el perfil de citocromos mediante espectroscopía. Otro estudio que convendría realizar sería complementar dicha cepa con el pFVRK, para saber si estas cepas están mutadas en el mismo gene o en genes diferentes.

El segundo ejemplo se refiere a tres mutantes *Tn5-mob* de *Sinorhizobium meliloti* (cepas Tb1, Tb9 y Tb16), que fueron seleccionadas en base a una capacidad incrementada para reducir el bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTB) a formazán (fenotipo Red⁺⁺). El TTB es reducido por deshidrogenasas generadas mediante el ciclo de Krebs, por lo que se presume que las mutantes Red⁺⁺ tienen una actividad respiratoria incrementada.

Las plantas de alfalfa inoculadas con las cepas Tb1, Tb9 y Tb16 tienen aumentos de peso seco de 70%, 59% y 56%, en comparación con las plantas inoculadas con la cepa silvestre. La cepa Tb1 tiene una expresión derreprimida del citocromo aa₃ en la fase estacionaria del crecimiento. La cepa Tb9 tiene una expresión derreprimida del citocromo cbb₃ y una expresión reprimida del citocromo aa₃. La cepa Tb16 presenta una expresión derreprimida de las dos oxidasas terminales aa₃ y cbb₃, característica fenotípica semejante a la cepa CFN030. La cepa Tb16 también posee un fenotipo simbiótico mejorado, y se encontró que los niveles de expresión de *fixNOQP* son mayores en la cepa Tb16 que en la cepa parental (Yurgel *et al.*, 1998). Posiblemente este fenotipo simbiótico se debe a una alteración de la cadena respiratoria, ya que al haber un incremento en los agentes reductores, la célula podría responder aumentando su respiración. Ninguna de las tres cepas ha sido caracterizada a nivel genético o espectroscópico. La expresión de citocromos de la cepa Tb16 es similar a la expresión de citocromos de la cepa CFN030, pero no se sabe si la mutante Tb16 presente resistencia a azida de sodio, además de que presenta niveles incrementados en la expresión de *fixNOQP* respecto a la cepa silvestre *S. meliloti* CXM1-188 (Yurgel *et al.*, 1998), mientras que en la cepa CFN030 la transcripción del operón *fixNOQP* es igual a la de la cepa silvestre *R. etli* CE3 (Miranda, 1995).

El tercer ejemplo es la cepa *Rhizobium etli* CFN037, obtenida mediante mutagénesis con *Tn5-mob* y seleccionada por su fenotipo TMPD⁺⁺. Esta cepa presenta una expresión derreprimida del citocromo aa₃ en microaerofilia y del citocromo cbb₃ en la fase post-exponencial del crecimiento, una FSN aumentada (las plantas inoculadas con la cepa CFN037 contienen 22% más nitrógeno que las plantas inoculadas con la cepa silvestre), y una mayor resistencia a azida de sodio, características similares al fenotipo de la cepa CFN030 (Miranda *et al.*, 1996). La caracterización molecular reveló que la inserción de *Tn5-mob* ocurrió en el promotor del operón *thiCOGE* (encargado de la biosíntesis de la vitamina B₁ o tiamina),

promoviendo la expresión constitutiva del gene *thiC* (Miranda-Ríos *et al.*, 1997). A partir del análisis funcional de la regulación de estos genes, se ha propuesto un interesante modelo de regulación post-transcripcional efectuado por una estructura de ARN conservada en numerosos microorganismos (Miranda-Ríos *et al.*, 2001; Stormo y Ji, 2001). La cepa CFN037 es un claro ejemplo de cómo el Tn5-*mob* puede provocar la expresión constitutiva de ciertos genes, y también ha revelado la participación de otro metabolito (una vitamina) en la expresión de la oxidasa *cbb₃* (Miranda-Ríos *et al.*, 1997). Se sabe que esta cepa provoca alteraciones en la asimilación y transporte de nitrógeno en las plantas inoculadas, pero esto no es un efecto directo de la respiración bacteriana (Silvente *et al.*, 2002).

Aunque la cepa CFN037 tiene características fenotípicas similares a las de la cepa CFN030, estas cepas no provienen de una mutación común. La cepa CFN037 fue afectada en el operón *thiCOGE* localizado en el plásmido simbiótico, mientras que la cepa CFN030 fue afectada en el cromosoma.

Los hechos y especulaciones en torno a las cepas CFN030 y CFN037 de *Rhizobium etli*, así como la cepa Az9 de *Mesorhizobium loti*, sugieren la existencia de varios mecanismos capaces de provocar resistencia a azida de sodio, con un incremento simultáneo en la FSN. Estos experimentos demuestran que la resistencia a azida puede utilizarse como una herramienta genética para aislar bacterias mutantes con una FSN incrementada.

CONCLUSIONES

La selección de mutantes resistentes a azida ha probado ser un método eficiente para la obtención de cepas con una capacidad incrementada en la fijación de nitrógeno.

Se caracterizó a nivel molecular la cepa mutante *Rhizobium etli* CFN030, que presenta un fenotipo resistente a azida de sodio, así como incrementos en su respiración y en su fijación simbiótica de nitrógeno, en comparación con la cepa silvestre. Esta cepa fue obtenida mediante mutagénesis de la cepa silvestre CE3 con el transposón Tn5-*mob*.

Para caracterizar esta cepa, se clonó un fragmento *EcoRI* de 5 kb que fue afectado por la inserción del Tn5-*mob*. Se obtuvo la secuencia de 1880 bases nucleotídicas de dicho fragmento.

El análisis de la secuencia obtenida revela 6 ORFs. El ORF 1 presenta el motivo Walker A del dominio asa-P, lo que sugiere que se trata de una proteína capaz de unir nucleótidos fosfatados. El ORF 6 presenta homología con una proteína hipotética conservada en numerosos microorganismos. Probablemente estas proteínas pertenecen a una familia no caracterizada todavía. Los ORFs 2/3/4/5 posiblemente son genes nuevos. Probablemente el ORF 2 es un gene solitario, y los ORFs 3/4/5 podrían formar un operón. La inserción del transposón fue localizada al principio del ORF 4, entre el primer y segundo codones.

Se hicieron estudios de complementación genética. El resultado negativo de estos estudios y la dominancia claramente observada por parte del fenotipo mutante, sugieren que el Tn5-*mob* provocó la expresión constitutiva de uno o varios genes.

Un estudio a mayor profundidad de la cepa CFN030 podría conducir a nuevos descubrimientos en la genética de bacterias.

PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

En particular, se necesitan más experimentos para explicar los hechos observados. A nivel genético, habría que probar si los ORFs 3/4/5 existen. En caso de existir, habría que determinar la función de las proteínas para las que codifican. Habría que confirmar que los ORFs 3/4/5 formen un operón, por medio de fusiones transcripcionales con el gene reportero *lacZ*, y determinar en qué condiciones se expresa este operón (como la concentración ambiental de oxígeno y/o nitrógeno, la ausencia de un metabolito, etc). Habría que elaborar mutantes no polares para saber qué ORF es responsable de cambios en el fenotipo, así como determinar si el fenotipo Az^R se debe a la represión del ORF 4 o a la desregulación del ORF 5. Estas mutaciones no polares podrían llevarse a cabo construyendo cepas mutantes donde se interrumpa la secuencia de cada ORF con un interposón. Con estos estudios se respondería a la pregunta: ¿El fenotipo se debe sólo a la inactivación del ORF 4, o a la expresión de otro ORF? A nivel bioquímico, podría aclararse la relación existente entre la resistencia a azida de sodio y la mayor eficiencia respiratoria y simbiótica, realizando estudios espectroscópicos de mayor alcance para determinar la expresión de citocromos en las cepas CE3, CFN030, CE3/pFVRK y CFN030/pFVRK. Es importante determinar la interrelación entre la expresión de las oxidasas terminales, la resistencia a azida y la capacidad simbiótica para fijar el nitrógeno, distinguiendo en qué grado participan las diferentes oxidasas terminales (citocromo *cbb*₃, citocromo *bd*) durante la simbiosis, aunque se trata de relaciones que por años no han sido bien entendidas, como puede observarse en la literatura. Para elucidar las alteraciones de la cadena respiratoria, podrían emplearse otras herramientas además de la espectroscopía, como la influencia de agentes inhibidores diferentes a la azida (por ejemplo, antimicina).

PERSPECTIVAS GENERALES

Las perspectivas para el estudio de la FSN son amplias, pero de aplicación mediata. Cada vez se ha ido encontrando una mayor complejidad en este proceso, lo que hace necesario caracterizar más bacterias mutantes, con el fin de aclarar las relaciones existentes entre la fijación simbiótica de nitrógeno y otros procesos metabólicos como la interacción bacteria-hospedero o la regulación que efectúan el oxígeno, el nitrógeno, u otros factores, en plantas y bacterias. La elaboración de plantas transgénicas ampliará las posibilidades al permitir hechos novedosos, como la nodulación de plantas por bacterias extrañas; o mejorar funciones que aumenten la energía química de la planta, como un incremento en la absorción de nutrientes, o una mayor eficiencia del reciclado de hidrógeno. La elaboración de bacterias recombinantes permitirá la expresión de otros genes que también pudieran ayudar a mejorar la fijación simbiótica de nitrógeno. Sin embargo, se debe ser realista de que no sólo se necesita un mayor conocimiento a nivel molecular, sino que es necesario realizar estudios de gran envergadura en otras áreas, como la ecología de suelos. Cada proyecto estará limitado por condiciones particulares, como la geografía y ecología del país o región, un cuidadoso diseño para la inoculación de plantas en el campo, y los factores socioeconómicos y humanos que determinan aspectos como la inversión en investigación científica, la productividad del campo, el beneficio de la población, los hábitos de los agricultores, y el efecto de las plantas transgénicas en la ecología y la salud. Para realizar todas estas mejoras, son necesarios proyectos multidisciplinarios a largo plazo. Aún cuando el día de hoy sea más barato importar alimentos, eso provoca depender económicamente de otros países. Nuestro país necesita mejorar su agricultura y reforestar los suelos, lo cual tiene otros efectos benéficos, como la conservación de los mantos acuíferos y la protección de la erosión. Las bacterias rizobiáceas también pueden tener aplicaciones antes no pensadas, como generación de energía eléctrica o biorremediación de suelos. La investigación sobre la fijación simbiótica de nitrógeno constituye un tópico fundamental para promover el desarrollo sustentable de las naciones, que a su vez requiere una mayor interacción entre la ciencia, la industria, la sociedad y el gobierno, tanto a nivel nacional como internacional.

BIBLIOGRAFÍA

Alexander P, Bahret MJ, Chaves J, Courts G, D'Alessio NS (1992)
Biología
 Englewood Cliffs: Prentice Hall, 717 pp.

Alexandratos N (1999)
 "World food and agriculture: Outlook for the medium and long term"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5908-5914

Alexandratos N (2003)
 "World agriculture: Towards 2015/2030"
 IFA-FAO Agriculture Conference "Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization"
 Roma, Italia, 26-28 de marzo de 2003

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997)
 "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs"
Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402

Anraku Y (1988)
 "Bacterial electron transport chains"
Ann. Rev. Biochem. 57: 101-132

Arslan E, Kannt A, Thöny-Meyer L, Hennecke H (2000)
 "The symbiotically essential cbb₃-type oxidase of *Bradyrhizobium japonicum* is a proton pump"
FEBS Letters 470: 7-10

Atlas RM, Bartha R (1998)
Microbial Ecology: Fundamentals and Applications
 Menlo Park: Addison-Wesley Longman, 4a. ed., 694 pp.

Avers CJ (1991)
Biología Celular
 México: Grupo Editorial Iberoamérica, 2a. ed., 748 pp.

Azarkina N, Siletsky S, Borisov V, von Wachenfeldt C, Hederstedt L, Konstantinov AA (1999)
 "A cytochrome bb'-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168"
J. Biol. Chem. 274: 32810-32817

Babcock GT, Wikström M (1992)
 "O₂ activation and the conservation of energy in cell respiration"
Nature 356: 301-309

Baginsky C, Rito B, Imperial J, Palacios JM, Ruiz-Argüeso T (2002)
 "Diversity and evolution of hydrogenase systems in *Rhizobia*"
Appl. Environ. Microbiol. 68: 4915-4924

Barquera Alcalde BL (1990)

El sistema respiratorio de Rhizobium phaseoli en vida libre y durante simbiosis

Tesis de Doctorado, UNAM, 87 pp.

Barquera B, García-Horsman A, Escamilla JE (1991a)

"Cytochrome d expression and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*"

Arch. Microbiol. 155: 114-119

Barquera B, García-Horsman A, Escamilla JE (1991b)

"An alternative non-cytochrome containing branch in the respiratory system of free-living *Rhizobium phaseoli*"

Arch. Microbiol. 155: 428-435

Batut J, Daveran-Mingot ML, David M, Jacobs J, Garnerone AM, Kahn D (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

Bauer CE, Elsen S, Bird TH (1999)

"Mechanisms for redox control of gene expression"

Annu. Rev. Microbiol. 53: 495-523

Berg D, Wiss A, Crossland L (1980)

"Polarity of Tn5 insertion mutations in *Escherichia coli*"

J. Bacteriol. 142: 439-446

Bernard M (1995)

Curso de Química Inorgánica

México: Compañía Editorial Continental, 454 pp.

Bosworth AH, Williams MK, Albrecht KA, Kwiatkowski R, Beynon J, Hankinson TR, Ronson CW, Cannon FF, Wacek TJ, Triplett EW (1994)

"Alfalfa yield response to inoculation with recombinant strains of *Rhizobium meliloti* with an extra copy of *dctABD* and/or modified *nifA* expression"

Appl. Environ. Microbiol. 60: 3815-3832

Bott M, Bolliger M, Hennecke H (1990)

"Genetic analysis of the cytochrome c aa₃ branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratory chain"

Mol. Microbiol. 4: 2147-2157

Bott M, Preisig O, Hennecke H (1992)

"Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*"

Arch. Microbiol. 158: 335-343

Brewin NJ (1991)

"Development of the legume root nodule"

Annu. Rev. Cell. Biol. 7: 191-226

Brom S, García de los Santos A, Stepkowsky T, Flores M, Dávila G, Romero D, Palacios R (1992)
"Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance"
J. Bacteriol. 174: 5183-5189

Brown TL, LeMay HE, Bursten BE (1993)
Química: La Ciencia Central
México: Prentice-Hall Hispanoamericana, 5a. ed., 1159 pp.

Burris HR (1991)
"Nitrogenases"
J. Biol. Chem. 266: 9339-9342

Calderón Flores A (1997)
Mutagénesis dirigida del locus que complementa a la mutante LM01 de Rhizobium etli
Tesis de Licenciatura, UNAM, 52 pp.

Castañeda MT, Rivas AM, García J (2003)
"Fitoextracción de plomo y cadmio de suelos contaminados mediante el uso de *Medicago sativa*"
Memorias del XXXVIII Congreso Mexicano de Química
Rev. Soc. Quím. Méx. 47, Núm. Especial, p. 56

Cevallos MA, Encarnación S, Leija A, Mora Y, Mora J (1996)
"Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate"
J. Bacteriol. 178: 1646-1654

Clark AJ, Satin L, Chu CC (1994)
"Transcription of the *Escherichia coli* *recE* gene from a promoter in Tn5 and IS50"
J. Bacteriol. 176: 7024-7031

Comadurán LF, Lara F, Soberón M (1998)
"Increased respiration through cytochrome d enhances microaerobic N₂ fixation in *Klebsiella pneumoniae*"
Biotech. Lett. 20: 489-493

Corpet F (1988)
"Multiple sequence alignment with hierarchical clustering"
Nucl. Acids Res. 16: 10881-10890

Cotter PA, Chepuri V, Gennis RB, Gunsalus RP (1990)
"Cytochrome o (*cyoABCDE*) and d (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product"
J. Bacteriol. 172: 6333-6338

- Cotter PA, Melville SB, Albrecht JA, Gunsalus RP (1997)
 "Aerobic regulation of cytochrome *d* oxidase (*cydAB*) operon expression in *Escherichia coli*: Roles of Fnr and ArcA in repression and activation"
Mol. Microbiol. 25: 605–615
- Craig NL (2002)
 "Mobile DNA: An introduction"
En
 Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM (eds.)
Mobile DNA II
 Washington: American Society for Microbiology Press, pp. 3-11
- Cruz MA (2002)
 "Alimentos transgénicos"
Gaceta Intersecciones Becarios Telmex, año VI, no. 21-22, pp. 20-23
- Daugherty M, Vonstein V, Overbeek R, Osterman A (2001)
 "Archaeal shikimate kinase, a new member of the GHMP-Kinase Family"
J. Bacteriol. 183: 292-300
- David M, Daveran ML, Batut J, Dedieu A, Domergue O, Ghai J, Hertig C, Boistard P, Khan D (1988)
 "Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*"
Cell 54: 671-683
- Delgado MJ, Bedmar EJ, Downie JA (1998)
 "Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation"
Adv. Microb. Physiol. 40: 191-231
- D'hooghe I, Michiels J, Vanderleyden J (1988)
 "The *Rhizobium etli* FixL protein differs in structure from other known FixL proteins"
Mol. Gen. Genet. 257: 576-580
- Dickson TR (1980)
Química: Enfoque Ecológico
 México: Limusa, 406 pp.
- Dixon ROD, Wheeler CT (1986)
Nitrogen fixation in plants
 New York: Chapman and Hall, 157 pp.
- Doyle WJ (2003)
 "Fertilizer industry and sustainability: From principle to action"
 IFA-FAO Agriculture Conference "Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization"
 Roma, Italia, 26-28 de marzo de 2003

- Dusha I, Bakos A, Kondorosi A, De Bruijn FJ, Schell J (1989)
 "The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium"
Mol. Gen. Genet. 219: 89-96
- Fedoroff NV, Cohen JE (1999)
 "Plants and population: Is there time?"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5903-5907
- Ferguson SJ (2001)
 "Keilin's cytochromes: How bacteria use them, vary them and make them"
Biochem. Soc. Trans. 29: 629-640
- Ferraioli S, Tatè R, Cermola M, Favre R, Iaccarino M, Patriarca EJ (2002)
 "Auxotrophic mutant strains of *Rhizobium etli* reveal new nodule development phenotypes"
Molec. Plant-Microbe Interact. 15: 501-510
- Fischer HM (1994)
 "Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*"
Microbiol. Rev. 58: 352-386
- Fortin Y, Phoenix P, Drapeau GR (1990)
 "Mutations conferring resistance to azide in *Escherichia coli* occur primarily in the *secA* gene"
J. Bacteriol. 172: 6607-6610
- Foussard M, Soupène E, Garnerone AM, Capela D, Cabanes D, Boistard P, Batut J (1998)
 "Regulation of nitrogen fixation gene expression in *Rhizobia*: An overview"
[En](#)
 Elmerich C, Kondorosi A, Newton WE (eds.)
Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century
 Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 101-106
- Fowden L (1979)
 "Nitrogen: The keystone to plant growth and metabolism"
[En](#)
 Hewitt EJ, Cutting CV (eds.)
Nitrogen Assimilation of Plants
 London: Academic Press, pp. 1-14
- Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret X (1997)
 "Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes"
Nature 387: 394-401
- Friedman AM, Long SR, Brown SE, Buikema WJ, Ausubel FM (1982)
 "Construction of broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants"
Gene 18: 289-296

Frink CR, Waggoner PE, Ausubel JH (1999)
 "Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1175-1180

Galibert F, Finan TM, Long SR, Pühler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Burhmaster J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernández-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RM, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J (2001)
 "The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*"
Science 293: 668-672

García-Horsman JA, Barquera B, Rumbley J, Ma J, Gennis RB (1994a)
 "The superfamily of heme-copper respiratory oxidases"
J. Bacteriol. 176: 5587-5600

García-Horsman JA, Berry E, Shapleigh JP, Alben JO, Gennis RB (1994b)
 "A novel cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks Cu_A"
Biochemistry 33: 3113-3119

Gardner EJ, Simmons MJ, Snustad DP (1998)
Principios de Genética
 México: Limusa, 4a. ed., 649 pp.

Girard L, Brom S, Dávalos A, López O, Soberón M, Romero D (2000)
 "Differential regulation of *fixN* reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade"
Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 1283-1292

Glick BR, Pasternak JJ (1998)
Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA
 Washington: American Society for Microbiology Press, 2a. ed., 683 pp.

González V, Bustos P, Ramírez-Romero MA, Medrano-Soto A, Salgado H, Hernández-González I, Hernández-Celis JC, Quintero V, Moreno-Hagelsieb G, Girard L, Rodríguez O, Flores M, Cevallos MA, Collado-Vides J, Romero D, Dávila G (2003)
 "The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments"
Genome Biol. 4: R36

Graham PH (1998)
 "Biological dinitrogen fixation: Symbiotic"

En
 Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (eds.)
Principles and Applications of Soil Microbiology
 Upper Saddle River: Prentice Hall, pp. 322-345

Graham PH, Vance CP (2000)

"Nitrogen fixation in perspective: An overview of research and extension needs"

Field Crops Res. 65: 93-106

Green GN, Kranz RG, Lorence RM, Gennis R (1984)

"Identification of subunit I as the cytochrome b_{558} component of the cytochrome d terminal oxidase complex of *Escherichia coli*"

J. Biol. Chem. 259: 7994-7997

Gu Y, Reshetnikova L, Li Y, Wu Y, Singh HYS, Ji X (2002)

"Crystal structure of shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis"

J. Mol. Biol. 319: 779-789

Guest JR, Lambden PR (1976)

"Mutants of *Escherichia coli* unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor"

J. Gen. Microbiol. 97: 145-160

Gupta SK, Gupta RC, Gupta AB, Seth AK, Bassin JK, Gupta A (2000)

"Recurrent acute respiratory tract infections in areas with high nitrate concentrations drinking water"

Environ. Health Perspect. 108: 363-366

Gupta SK, Gupta RC, Gupta AB, Seth AK, Bassin JK, Gupta A, Sharma ML (2001)

"Recurrent diarrhea in children living in areas with high levels of nitrate in drinking water"

Arch. Environ. Health 56: 369-373

Gutiérrez D, Hernando Y, Palacios JM, Imperial J, Ruiz-Argüeso T (1997)

"FnrN controls symbiotic nitrogen fixation and hydrogenase activities in *R. leguminosarum* bv *viciae*"

J. Bacteriol. 179: 5264-5270

Gutiérrez-Zamora ML, Martínez-Romero E (2001)

"Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.)"

J. Biotechnol. 91: 117-126

Hall JL, Flowers TJ, Roberts RM (1981)

Plant Cell Structure and Metabolism

London: Longman Group Limited, 2a. ed., 543 pp

Hardarson G (1993)

"Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation"

Plant and Soil 152: 1-17

Hardy RWF, Knight E (1967)

"ATP-dependent reduction of azide and HCN by N_2 -fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*"

Biochim. Biophys. Acta 139: 69-90

Harold FM (1986)

The Vital Force: A Study of Bioenergetics

New York: W. H. Freeman, 577 pp.

Hennecke H (1993)

"The role of respiration in symbiotic nitrogen fixation"

En

Palacios R, Mora J, Newton WE (eds.)

New Horizons in Nitrogen Fixation

Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 55-64

Herrera L, Larqué A, Serratos JA (2001)

"La biotecnología en el sector agrícola"

En

Bolívar F (coord.)

Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: Retos y oportunidades

México: SEP-CONACyT, pp. 145-167

Herridge D, Rose I (2000)

"Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes"

Field Crops Res. 65: 229-248

Hopkins WG (1995)

Introduction to Plant Physiology

New York: John Wiley & Sons, 512 pp.

Horton HR (1993)

Bioquímica

México: Prentice Hall Hispanoamericana, 1230 pp.

Huerta-Zepeda A, Ortuño L, DuPont G, Durán S, Lloret A, Merchant-Larios H, Calderón J (1997)

"Isolation and characterization of *Rhizobium etli* mutants altered in degradation of asparagine"

J. Bacteriol. 179: 2068-2072

Huheey JE, Keiter EA, Keiter RL (1997)

Química Inorgánica

México: Oxford University Press Harla México, 4a. ed., 1023 pp.

Hynes MF, Finan TM (1998)

"General genetic knowledge"

En

Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds.)

The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria

Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 25-43

IngledeW WJ, Poole RK (1984)

"The respiratory chains of *Escherichia coli*"

Microbiol. Rev. 48: 222-271

Iuchi S, Lin ECC (1988)

"*arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1888-1892

Iuchi S, Cameron DC, Lin ECC (1989)

"A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*"

J. Bacteriol. 171: 868-873

Jensen ES, Hauggaard-Nielsen H (2003)

"How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment?"

Plant and Soil 252: 177-186

Jones JDG, Gutterson N (1987)

"An efficient mobilizable cosmid vector, pRK7813, and its use in a rapid method for marker exchange in *Pseudomonas fluorescens* strain HV37a"

Gene 61: 299-306

Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon M, Bourg G, Ramuz M, Allardet-Servent A (1998)

"Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the proteobacteria"

J. Bacteriol. 180: 2749-2755

Kaminski PA, Batut J, Boistard P (1998)

"A survey of symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobia*"

En

Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds.)

The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria

Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 431-460

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakzaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2000)

"Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*"

DNA Res. 7: 331-338

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S (2002)

"Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110"

DNA Res. 9:189-197

Keilin D (1925)

"On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants"
Proc. R. Soc. B 98: 312-339

Kishore GM, Shewmaker C (1999)

"Biotechnology: Enhancing human nutrition in developing and developed worlds"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5968-5972

Kitts CL, Ludwig RA (1994)

"*Azorhizobium caulinodans* respire with at least four terminal oxidases"
J. Bacteriol. 176: 886-895

Krell T, Coggins JR, Laphorn AJ (1998)

"The three-dimensional structure of shikimate kinase"
J. Mol. Biol. 278: 983-997

Layzell DB, Díaz del Castillo L, Hunt S, Kuzma M, van Cauwenberghe O, Oresnik I (1993)

"The regulation of oxygen and its role in regulating nodule metabolism"

En

Palacios R, Mora J, Newton WE (eds.)

New Horizons in Nitrogen Fixation

Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 393-398

Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L (2002)

"Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases"
J. Mol. Biol. 317: 41-72

López O, Morera C, Miranda-Ríos J, Girard L, Romero D, Soberón M (2001)

"Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: Role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation"

J. Bacteriol. 183: 6999-7006

Luz JG, Hassig CA, Pickle C, Godzik, Meyer BJ, Wilson IA (2003)

"XOL-1, primary determinant of sexual fate in *C. elegans*, is a GHMP kinase family member and a structural prototype for a class of developmental regulators"

Genes Dev. 17: 977-990

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000)

Brock Biology of Microorganisms

Upper Saddle River: Prentice Hall, 9a. ed., 991 pp.

Maier RJ, Triplett EW (1996)

"Toward more productive, efficient, and competitive nitrogen-fixing symbiotic bacteria"

Crit. Rev. Plant Sci. 15: 191-234

- Malakoff D (1998)
"Death by suffocation in the Gulf of Mexico"
Science 281: 190-192
- Mandon K, Kaminski PA, Elmerich CE (1994)
"Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*"
J. Bacteriol. 176: 2560-2568
- Marroquí S, Zorreguieta A, Santamaría C, Temprano F, Soberón M, Megías M, Downie JA (2001)
"Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants"
J. Bacteriol. 183: 854-864
- Mathot, H (2003)
"Challenges facing the fertilizer industry"
IFA-FAO Agriculture Conference "Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization"
Roma, Italia, 26-28 de marzo de 2003
- McKee T, McKee JR (1996)
Biochemistry: An Introduction
Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, 638 pp.
- Membrillo Hernández J (1991)
Regulación de la expresión de las oxidasas terminales o y aa₃ en Rhizobium phaseoli: Aislamiento de una mutante respiratoria con mayor fijación de nitrógeno
Tesis de Licenciatura, UNAM, 55 pp.
- Milner-White EJ, Coggins JR, Anton IA (1991)
"Evidence for an ancestral core structure in nucleotide-binding proteins with the type A motif"
J. Mol. Biol. 221: 751-754
- Miranda Ríos J (1995)
Genética molecular de genes involucrados en la expresión de oxidasas terminales en Rhizobium etli
Tesis de Doctorado, UNAM, 87 pp.
- Miranda J, Membrillo-Hernández J, Tabche ML, Soberón M (1996)
"*Rhizobium etli* cytochrome mutants with derepressed expression of cytochrome terminal oxidases and enhanced symbiotic nitrogen fixation"
Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 182-188
- Miranda-Ríos J, Morera C, Taboada H, Dávalos A, Encarnación S, Mora J, Soberón M (1997)
"Expression of thiamin biosynthetic genes (*thiCOGE*) and production of symbiotic terminal oxidase *cbb₃* in *Rhizobium etli*"
J. Bacteriol. 179: 6887-6893

Miranda-Ríos J, Navarro M, Soberón M (2001)

"A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9736-9741

Mitchell P (1961)

"Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism"

Naturwissenschaften 191: 144-148

Mitchell P (1979)

"Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences"

Science 206: 1148-1159

Morett E, Fischer HM, Hennecke H (1991)

"Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein"

J. Bacteriol. 173: 3478-3487

Myllykallio H, Liebl U (2000)

"Dual role for cytochrome *cbb*₃ oxidase in clinically relevant proteobacteria"

Trends Microbiol. 8: 542-543

Noel KD, Sánchez A, Fernández L, Leemans J, Cevallos MA (1984)

"*Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions"

J. Bacteriol. 158: 148-155

Norse D (2003)

"Fertilizers and world food demand implications for environmental stresses"

IFA-FAO Agriculture Conference "Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization"

Roma, Italia, 26-28 de marzo de 2003

Oláh B, Kiss E, Györgypál Z, Borzi J, Cinege G, Csanádi G, Batut J, Kondorosi A, Dusha I (2001)

"Mutation in the *ntrR* gene, a member of the *vap* gene family, increases the symbiotic efficiency of *Sinorhizobium meliloti*"

Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 887-894

Oliver DB, Cabelli RJ, Dolan KM, Jarosik GP (1990)

"Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8227-8231

Ortega F (1999)

"La planta de Cosoleacaque, hacia su desaparición: Colapso de la industria petroquímica mexicana"

Proceso (1208)

- Park KW, Kim KJ, Howard AJ, Stark BC, Webster DA (2002)
 "Vitreoscilla hemoglobin binds to subunit I of cytochrome bo ubiquinol oxidases"
J. Biol. Chem. 277: 33334-33337.
- Parks WJ (2003)
 "Defining the Green Revolution"
<http://www.arches.uga.edu/~wparks/ppt/green/>
- Pemex (1988)
El Petróleo
 México: Petróleos Mexicanos, ed. conmemorativa, p. 133
- Poole RK (1983)
 "Bacterial cytochrome oxidases: A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins"
Biochim. Biophys. Acta 726: 205-243
- Poole RK (1988)
 "Bacterial cytochrome oxidases"
En
 Anthony C. (ed.)
Energy Transduction in Bacteria
 London: Academic Press, pp. 231-291
- Postgate JR (1987)
Nitrogen Fixation
 London: Edward Arnold, 2a. ed., pp. 8-9
- Preisig O, Zufferey R, Thöny-Meyer L, Appleby CA, Hennecke H (1996a)
 "A high-affinity cbb₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*"
J. Bacteriol. 178: 1532-1538
- Preisig O, Zufferey R, Hennecke H (1996b)
 "The *Bradyrhizobium japonicum* fixGHIS genes are required for the formation of the high-affinity cbb₃-type cytochrome oxidase"
Arch. Microbiol. 165: 297-305
- Ramírez M, Valderrama B, Arredondo-Peter R, Soberón M, Mora J, Hernández G (1999)
 "*Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin: Effects on freeliving and symbiosis"
Mol. Plant-Microbe Interact. 12: 1008-1015

Reznikoff WS (2002)

"Tn5 Transposition"

En

Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM (eds.)

Mobile DNA II

Washington: American Society for Microbiology Press, pp. 403-422

Reznikoff WS (2003)

"Tn5 as a model for understanding DNA transposition"

Mol. Microbiol. 47: 1199-1206

Richardson DJ (2000)

"Bacterial respiration: A flexible process for a changing environment"

Microbiology 14: 551-571

Rocha M, De Las Peñas A (1990)

"La fijación del nitrógeno: La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa a nivel molecular"

Investigación Científica y Tecnológica 12: 78-82

SAGARPA (2002)

"Hechos: Sector agroalimentario y pesquero"

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

Publicado el 30 de agosto

Salgado NT, Castañeda MT, García J (2003)

"Fitorremediación de suelos contaminados con Cd y Pb usando trébol blanco"

Memorias del XXXVIII Congreso Mexicano de Química

Rev. Soc. Quím. Méx. 47, Núm. Especial, p. 56

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)

Molecular cloning: A laboratory manual

Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a. ed., 3 vol.

Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A (1990)

"The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins"

Trends Biochem. Sci. 15: 430-434

Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H, Martínez-Romero E (2002)

"Advances in *Rhizobium* research"

Crit. Rev. Plant Sci. 21: 323-378

Sharma SB, Sakadevan K, Sharma S (1997)

"Mutations conferring azide resistance enhance symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium loti*"

Plant and Soil 189: 221-229

Sies H, Brauser B, Bücher T (1969)

"On the state of mitochondria in perfused liver: Action of sodium azide on respiratory carriers and respiration"

FEBS Letters 5: 319-323

Silvente S, Blanco L, Camas A, Ortega JL, Ramírez M, Lara-Flores M (2002)

"*Rhizobium etli* mutant modulates carbon and nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris* nodules"

Mol. Plant-Microbe Interact. 15: 728-733

Simon R, Priefer U, Pühler A (1983)

"A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria"

Biotechnology 1: 784-791

Simon R (1984)

"High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon"

Mol. Gen. Genet. 196: 413-420

Slater EC (1953)

"Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain"

Nature 172: 975-978

Slater EC (2003)

"Keilin, cytochrome, and the respiratory chain"

J. Biol. Chem. 278: 16455-16461

Soberón M, Williams HD, Poole RK, Escamilla E (1989)

"Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation"

J. Bacteriol. 171: 465-472

Soberón M, Membrillo-Hernández J, Aguilar GR, Sánchez F (1990)

"Isolation of *Rhizobium phaseoli* Tn5-induced mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases o and aa₃"

J. Bacteriol. 172: 1676-1680

Soberón M, López O, Morera C, Girard ML, Tabche ML, Miranda J (1999)

"Enhanced nitrogen fixation in a *Rhizobium etli nrtC* mutant that overproduces the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic terminal oxidase cbb₃"

Appl. Environ. Microbiol. 65: 2015-2019

Socolow RH (1999)

"Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6001-6008

- Soupène E, Foussard M, Boistard P, Truchet G, Batut J (1995)
 "Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂-fixation gene expression within the alfalfa root nodule"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3759-3763
- Southern EM (1975)
 "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis"
J. Molec. Biol. 98: 503-517
- Spaink HP, Okker RJ, Wijffelman CA, Tak T, Goosen-de Roo L, Pees E, van Brussel AA, Lugtenberg BJ (1989)
 "Symbiotic properties of *rhizobia* containing a flavonoid-independent hybrid nodD product"
J. Bacteriol. 171: 4045-4053
- Spiro S, Guest JR (1991)
 "Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*"
Trends Biochem. Sci. 16: 310-314
- Stormo GD, Ji Y (2001)
 "Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression?"
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9465-9467
- Sullivan JT, Trzebiatowski JR, Cruickshank RW, Gouzy J, Brown SD, Elliot RM, Fleetwood DJ, McCallum NG, Rossbach U, Stuart GS, Weaver JE, Webby RJ, De Bruijn FJ, Ronson CW (2002)
 "Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A"
J. Bacteriol. 184: 3086-3095
- Surpin MA, Moshiri F, Murphy AM, Maier R (1994)
 "Genetic evidence for a fourth terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*"
Gene 143: 73-77
- Surpin MA, Lübben M, Maier RJ (1996)
 "The *Bradyrhizobium japonicum* *coxWXYZ* gene cluster encodes a bb₃-type ubiquinol oxidase"
Gene 183: 201-206
- Surpin MA, Maier RJ (1999)
 "Symbiotic deficiencies associated with a *coxWXYZ* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*"
Appl. Environ. Microbiol. 65: 339-341
- Tabche ML, García EG, Miranda J, Escamilla JE, Soberón M (1998)
 "*Rhizobium etli* *cycHJKL* gene locus involved in c-type cytochrome biogenesis: Sequence analysis and characterization of two *cycH* mutants"
Gene 208: 215-219
- Taiz L, Zeiger E (1998)
Plant Physiology
 Sunderland: Sinauer, 2a. ed., 792 pp.

Téllez-Sosa J, Soberón N, Vega-Segura A, Torres-Márquez ME, Cevallos MA (2002)
 "The *Rhizobium etli cyaC* product: Characterization of a novel adenylate cyclase class"
J. Bacteriol. 184: 3560-3568

United Nations (2001)
Population, Environment and Development: The Concise Report
 New York: United Nations, publication S.01.XXXI.15, 83 pp.

van Berkum P, Eardly BD (1998)
 "Molecular Evolutionary Systematics of the *Rhizobiaceae*"
En
 Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds.)
The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria
 Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-24

van Rhijn P, Goldberg RB, Hirsch AM (1998)
 "*Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene"
Plant Cell 10: 1233-1250

van Rhijn P, Fujishige NA, Lim PO, Hirsch AM (2001)
 "Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by
Rhizobium leguminosarum biovar *viciae*"
Plant Physiol. 126: 133-144

Vance CP (1998)
 "Legume symbiotic nitrogen fixation: Agronomic aspects"
En
 Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds.)
The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria
 Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 509-530

Vázquez R (2002)
Termodinámica biológica
 México: AGT Editor, 223 pp.

Verkhovsky MI, Morgan JE, Wikström M (1994)
 "Oxygen binding and activation: Early steps in the reaction of oxygen with cytochrome c oxidase"
Biochemistry 33: 3079-3086

von Wachenfeldt C, Hederstedt L (2002)
 "Respiratory cytochromes, other heme proteins, and heme biosynthesis"
En
 Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds.)
Bacillus subtilis and its close relatives: From genes to cells
 Washington: American Society for Microbiology Press, pp. 163-179

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982)

"Distantly related sequences in the α - and β - subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold"

EMBO J. 1: 945-951

Wang T, Martínez J, López IM (2001)

"*Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas"

En

Martínez E, Martínez J (eds.)

Microbios en línea

México: UNAM, pp. 131-156

<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>

Westhoff P (1998)

Molecular plant development: From gene to plant

New York: Oxford University Press, 272 pp.

Wonnacott P, Wonnacott R (1992)

Economía

Madrid: McGraw-Hill, 4a. ed., 995 pp.

World Bank (2000)

"Fertilizers: Nitrogen"

Global Commodity Markets (abril): 60-61

Xoconostle B, Ruiz R (2002)

"Impacto de la biotecnología agrícola en cultivos: El caso de las micorrizas"

Avance y Perspectiva 21: 263-266

Yurgel SN, Soberón M, Sharypova LA, Miranda J, Morera C, Simarov BV (1998)

"Isolation of *Sinorhizobium meliloti* Tn5 mutants with altered cytochrome terminal oxidase expression and improved symbiotic performance"

FEMS Microbiology Letters 165: 167-173

Zuberer, DA (1998)

"Biological dinitrogen fixation: Introduction and nonsymbiotic"

En

Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (eds.)

Principles and Applications of Soil Microbiology

Upper Saddle River: Prentice Hall, pp. 295-321