

03081

12
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE
FIJACION DE NITROGENO**

**Efecto de la expresión de un gen heterólogo de
hemoglobina en *Rhizobium etli*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

P R E S E N T A

MARIO RAMIREZ YAÑEZ

Cuernavaca, Mor.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

274642



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.

03081

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Postgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno.**

**EFFECTO DE LA EXPRESION DE UN GEN HETEROLOGO
DE HEMOGLOBINA EN Rhizobium etli.**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica
presenta**

M. en C. Mario Ramírez Yáñez.

Cuernavaca, Morelos, 1999.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Georgina Hernández Delgado en el Programa de Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCION.	
1. La simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.	3
2. El O ₂ y la fijación de nitrógeno.	8
2.1. Control de la concentración de O ₂ en el nódulo.	8
2.2. La nitrogenasa: sensibilidad por O ₂ .	12
2.3. La leghemoglobina y el transporte de O ₂ al bacteroide.	14
2.4. La regulación por O ₂ de los genes <i>nif/fix</i> en <i>Rhizobium</i> .	21
2.5. Cadenas respiratorias en <i>Rhizobium</i> en vida libre y bacteroides.	25
2.6. Mecanismos de la regulación de la expresión génica en respuesta a la disponibilidad de O ₂ .	28
3. La hemoglobina de <i>Vitreoscilla</i> sp. y su uso biotecnológico.	36
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	43
III. Materiales y Métodos, Resultados: <i>Rhizobium etli</i> genetically engineered for the heterologous expression of <i>Vitreoscilla</i> sp. hemoglobin: effects on free-living and symbiosis.	46
IV. DISCUSION	55
V. REFERENCIAS	69

RESUMEN

La concentración de O_2 es un factor ambiental importante en la regulación de la expresión de los genes de fijación de nitrógeno en *Rhizobium*. En este trabajo se investigó el efecto de la expresión heteróloga de la hemoglobina de *Vitreoscilla* sp., VHb, la cual une el oxígeno de manera reversible, en *Rhizobium etli*. El gen *vhb* se subclonó en un vector de transformación estable, para dar lugar al plásmido pMR4, el cual se expresó bajo la acción de su promotor nativo en la cepa CE3 de *R. etli*. El gen *vhb* se expresó en cultivos en vida libre de *R. etli* CE3/pMR4, lo cual se demostró por medio de espectros diferenciales de monóxido de carbono y electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La síntesis de VHb en cultivos de vida libre en condiciones limitantes de O_2 propició un incremento en la actividad respiratoria, en el contenido de energía química y en la expresión del gen *nifHc*. Los bacteroides aislados de los nódulos de frijol inducidos por la cepa *R. etli* CE3/pMR4 expresaron el gen *vhb*, lo cual se demostró por ensayos de hibridación del tipo "slot blot", al utilizar como molde el RNA total de los bacteroides. Las plantas de frijol que se inocularon con *R. etli* CE3/pMR4 mostraron un incremento en la actividad de nitrogenasa, 68%, y en el contenido total de nitrógeno, 14 a 53%, con respecto a las plantas inoculadas con la cepa *R. etli* CE3. Estos resultados nos permiten proponer que la síntesis de VHb en *R. etli* CE3/pMR4 mejora la actividad respiratoria tanto en cultivos en vida libre como en simbiosis, lo que induce una alta fijación de nitrógeno en las plantas de frijol inoculadas con esta cepa.

ABSTRACT

Oxygen concentration is an environmental signal that regulates nitrogen fixation in the *Rhizobium* - legume symbiosis. We investigated the effect of the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin (VHb), which is an oxygen-binding protein, in *Rhizobium etli*. The *vhb* gene and its native promoter were subcloned in the plasmid pMR4 and transformed into the *R. etli* strain CE3. Free-living cultures of engineered *R. etli* CE3 expressed the *vhb* gene, as shown by the CO-difference spectral and sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analyses of cell extracts. The expression of *vhb* in free-living *R. etli* grown under most limiting oxygen-concentrations resulted in an increase in the respiratory activity, the chemical energy content and expression of the nitrogen-fixation gene *nifHc*. Bacteroids isolated from nodules of bean plants inoculated with the engineered *R. etli* CE3 expressed the *vhb* gene, as shown by RNA slot-blot analysis. Bean plants inoculated with the engineered strain exhibited higher nitrogenase activity and total nitrogen contents (68% and 14 to 53%, respectively) than the bean plants inoculated with the *R. etli* wild type. These results suggest that the synthesis of VHb in engineered *R. etli* stimulated the respiratory efficiency of free-living rhizobia, and also probably of symbiotic bacteroids, thus leading to higher levels of symbiotic nitrogen fixation.

I. INTRODUCCION

1. La simbiosis *Rhizobium-leguminosa*.

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacterias Gram-negativas aeróbicas, las cuales pueden desarrollarse en dos hábitats distintos. Los rhizobia son habitantes del suelo, ya que ocupan la rizosfera con una forma de vida saprófita; además, pueden vivir como endosimbiontes de los nódulos en las plantas leguminosas. La interacción de los rhizobia y las plantas leguminosas da como resultado la formación de un órgano nuevo, el nódulo, en el cual la bacteria es capaz de reducir el nitrógeno atmosférico, N_2 , hasta amonio, NH_4^+ .

El N_2 es el elemento mas abundante en la atmósfera terrestre, ya que representa el 80% de las gases que la forman, sin embargo, las plantas y los animales son incapaces de utilizarlo como tal para crecer. La reducción biológica de N_2 atmosférico hasta NH_4^+ es realizada por organismos procariontes, y se encuentra tanto en eubacterias como en arqueobacterias (Young, 1992). Algunos organismos fijadores de N_2 establecen simbiosis con las plantas superiores, como es el caso de las bacterias del suelo de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, las cuales se asocian con plantas de la familia Leguminosae.

La mayor parte del N_2 fijado biológicamente proviene de la asociación simbiótica que existe entre los rhizobia y las raíces de las leguminosas (Vance y Graham, 1995). Las leguminosas proveen entre 25 y 35% de la proteína mundial. Aproximadamente 250 millones de hectáreas alrededor del mundo se cultivan con leguminosas, las cuales fijan aproximadamente 90 T N/año. La cantidad de N_2 que se fija por este medio es impresionante, ya que

resulta de la actividad de sólo unos cuantos kilogramos del complejo enzimático nitrogenasa (Vance, 1996). Para obtener una cantidad equivalente de N_2 fijado por el método industrial de Haber-Bosch se requerirían 288 T de combustibles fósiles, con un costo aproximado de 30 billones de dólares anuales (Vance, 1996). Por lo tanto, la evidente importancia económica de este sistema biológico ha impulsado a un gran número de investigadores a incorporarse en esta área provocando que las investigaciones en la simbiosis leguminosa-rhizobia estén mas avanzadas que otros sistemas simbióticos.

El proceso para la fijación simbiótica de nitrógeno inicia con la infección de las raíces de la planta por las bacterias. Este evento biológico comienza con un intercambio de señales moleculares que modulan la respuesta y las condiciones para el inicio de la interacción entre los simbioses (Hirsch, 1992; Schultze *et al.*,1992). La señal molecular de *Rhizobium*, que juega un papel fundamental en la inducción de la etapas iniciales de la nodulación, son los lipo-oligosacáridos y se conocen como los Factores Nod, o factores de nodulación (Spaink y Lugtenberg, 1994). Los genes bacterianos involucrados en la síntesis de los factores de nodulación son los genes *nod* (nodulación). Estos genes no se expresan en vida libre con excepción de *nodD*, el cual se expresa de manera constitutiva. La proteína NodD tiene la capacidad de reconocer y, posteriormente, unir flavonoides específicos que son secretados por las raíces de la planta huésped (Goethals *et al.*,1992). Una vez que se une al flavonoide, NodD se convierte en el activador transcripcional de los demás genes *nod* (Fisher y Long, 1992), los cuales codifican para las enzimas involucradas en la síntesis del factor Nod. Posteriormente los rhizobia se adhieren a los pelos radicales de la planta, los cuales se deforman permitiendo que la bacteria penetre en la planta a través del llamado "hilo de infección". De manera simultánea a este proceso,

las células corticales se vuelven mitóticamente activas, lo que da lugar al primordio del nódulo. El hilo de infección se desarrolla hasta el primordio del nódulo, en donde las bacterias se liberan en el citosol de las células de la raíz. Estas bacterias son rodeadas por una membrana de origen vegetal, denominada membrana peribacteroidal (MPB). El primordio de nódulo sigue su desarrollo hasta convertirse en un nódulo maduro, en donde la bacteria se diferencia a su forma endosimbiótica, a la cual se conoce como bacteroide. Durante este proceso *Rhizobium* sufre un cambio tanto fisiológico como morfológico, que es el resultado del cambio de un ambiente aeróbico a uno microaeróbico en donde la baja disponibilidad del O_2 altera su metabolismo global. En la tabla 1 se muestran algunos procesos metabólicos que se modifican durante la diferenciación de los rhizobia en bacteroides. A los bacteroides junto con la membrana peribacteroidal que los engloba, se les conoce como simbiosomas. En esta etapa la bacteria inicia la síntesis de la nitrogenasa, la cual cataliza la reducción del N_2 atmosférico en NH_4^+ , el cual se utiliza para el metabolismo de la bacteria, y el excedente se exporta hacia la planta.

Los eventos anteriores varían con el tipo de nódulo de que se trate, es decir, en los indeterminados o determinados (Fig. 1). Los nódulos de tipo indeterminado presentan una forma cilíndrica, un meristemo persistente y la división celular se inicia en la corteza interna de la raíz. Estos nódulos son característicos de las plantas de regiones templadas, como la alfalfa, el trébol y el chícharo y los productos de aminación primaria son las amidas. Los nódulos determinados tienen una forma esférica, su meristemo tiene una actividad finita y la división celular se inicia en la corteza externa aunque cesa durante el desarrollo del nódulo (Hirsch, 1992).

Tabla 1. Cambios metabólicos durante la diferenciación de *Rhizobium* en vida libre a bacteroide (Tomado de Werner, 1992)

Proceso Metabólico	Cambio en el Bacteroide
División Celular	Ausente
Viabilidad	Reducida
Capacidad Osmótica	Aumentada
Producción de Exopolisacáridos	Reducida
Metabolismo de Carbono	*Acumulación de poli- β -hidroxibutirato (PHB)
Cadenas Respiratorias	Oxidasas terminales con alta afinidad por O ₂
Actividad de Nitrogenasa	10% de la proteína soluble

*No en todas las especies

La forma final de estos nódulos resulta del aumento en el tamaño de las células. Los nódulos determinados son característicos de plantas de regiones subtropicales y tropicales, como el frijol y la soya, y los productos de aminación primaria son los ureídos (Hirsch, 1992). En la zona interna del nódulo determinado se han identificado dos tipos celulares, las células infectadas y las no infectadas, cada una con funciones específicas (Fig. 1).

Las etapas en la formación del nódulo se caracterizan por la expresión de genes "nódulo-específicos" por parte de la planta, los cuales codifican para proteínas vegetales que se conocen como "nodulinas". Las nodulinas que se expresan durante la formación del nódulo se llaman nodulinas tempranas, y participan en el proceso de infección y desarrollo del nódulo.

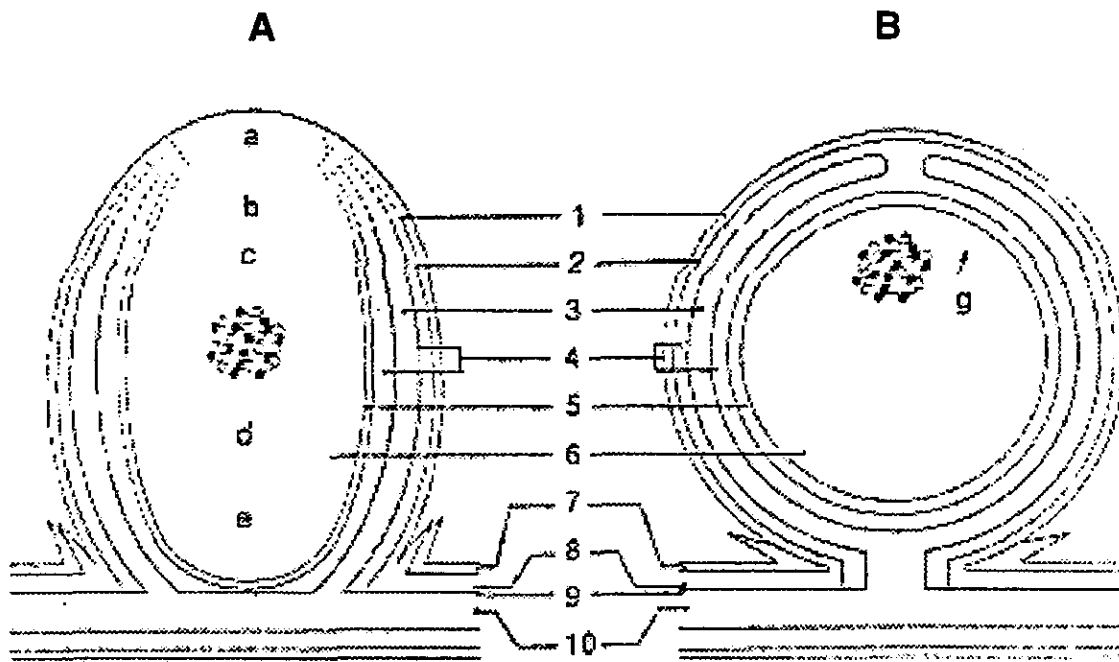


Figura 1. Esquema de un nódulo indeterminado (A) y uno determinado (B).

- 1, Corteza del nódulo. 2, Endodérmis. 3, Haz vascular. 4, Parénquima.
 5, Capa límite. 6, Tejido central. 7, Epidérmis de la raíz. 8, Corteza.
 9, Endodérmis. 10, Cilindro central de la raíz.
 a, zona meristemática; b, zona de infección; c, interzona; d, zona de fijación de nitrógeno; e, zona senescente; f, células infectadas; g, células no infectadas (tomado de Franssen *et al.*, 1992).

El producto de los genes de nodulinas que se expresan durante el proceso de fijación de N_2 se llaman nodulinas tardías, las cuales están involucradas en la interacción de la célula vegetal con el endosimbionte, así como en la especialización metabólica del nódulo (Nap y Bisseling, 1990; Sánchez *et al.*, 1991; de Bruijn y Schell, 1992). En esta etapa de la simbiosis la nitrogenasa se sintetiza en los bacteroides e inicia la fijación de N_2 .

2. El O_2 y la fijación de nitrógeno.

Se ha considerado que el O_2 es un factor que activa la fijación simbiótica de nitrógeno. La concentración de O_2 es un factor importante que regula las dos vías metabólicas principales de los rhizobia en el estado simbiótico: la respiración y la fijación de N_2 .

Una de las características más notables de la fijación biológica de N_2 es su sensibilidad por el O_2 . La nitrogenasa, el complejo enzimático que cataliza la reducción del N_2 atmosférico en NH_4^+ , se inactiva rápida e irreversiblemente al exponerla al O_2 . De aquí que la fijación de N_2 y el O_2 sean incompatibles. Por otra parte, el O_2 es esencial para la supervivencia de los diazotófos que son aerobios estrictos, como es el caso de *Rhizobium*. En la raíz, el nódulo de la planta provee al simbiote bacteriano de un ambiente en donde tendrá un flujo de O_2 para la respiración del bacteroide, así como una baja tensión de O_2 para prevenir la inactivación de la nitrogenasa. Lo anterior es posible a través de dos mecanismos: i) la formación de una barrera física al paso del O_2 , y ii) la expresión de una hemoproteína acarreadora de O_2 , la leghemoglobina (Lb).

2.1. Control de la concentración de O_2 en el nódulo:

la barrera física para la difusión de oxígeno dentro del nódulo.

El macrosimbionte participa en la regulación de la concentración de O_2 al establecer una barrera física para la difusión de O_2 en el nódulo. El nódulo es una estructura especializada que se deriva de la células de la corteza. En este órgano el O_2 penetra por difusión. En los nódulos de las leguminosas la

diferencia de concentración entre el O₂ externo y el O₂ de las células infectadas es muy grande: en los nódulos determinados de soya la concentración de O₂ en la zona central del nódulo es entre 3 y 30 nM en comparación con 260 μM en la rizosfera, lo que corresponde a cuatro ordenes de magnitud menor en el interior que en el exterior del nódulo (Layzell y Hunt, 1990). Esta diferencia se debe a la alta tasa de respiración dentro del nódulo con el consecuente consumo de O₂, así como a la presencia de una barrera a la difusión de los gases que se sitúa en la corteza interna de los nódulos. La evidencia que indica la existencia de una barrera de difusión en las células corticales se presentó por primera vez por Tjepkema y Yocum (1974), quienes insertaron un microelectrodo para medir la concentración de O₂ dentro de los nódulos de la soya, y observaron que la concentración de O₂ se abate drásticamente en la región de la corteza interna (Fig. 2). Dentro de la zona central del nódulo la concentración de O₂ estuvo por debajo del límite de detección del electrodo. En los nódulos de chícharo se obtuvieron resultados similares (Witty *et al.*, 1987). Se sabe que la corteza interna del nódulo está constituida de 1 a 5 estratos de células con pared celular delgada, que aparentemente carecen de espacios intercelulares, a las cuales se les llama los "estratos limitantes" (Atkins *et al.*, 1993) (Fig. 1). La barrera de difusión al O₂ en los nódulos no es estática, pues se ha observado que responde a diferentes condiciones ambientales que pudieran inactivar de manera directa o indirecta a la nitrogenasa (Layzell *et al.*, 1993). Los mecanismos por los cuales se regula la permeabilidad al O₂ han sido objeto de muchos estudios que han permitido establecer el posible mecanismo de acción de la barrera física de difusión al O₂.

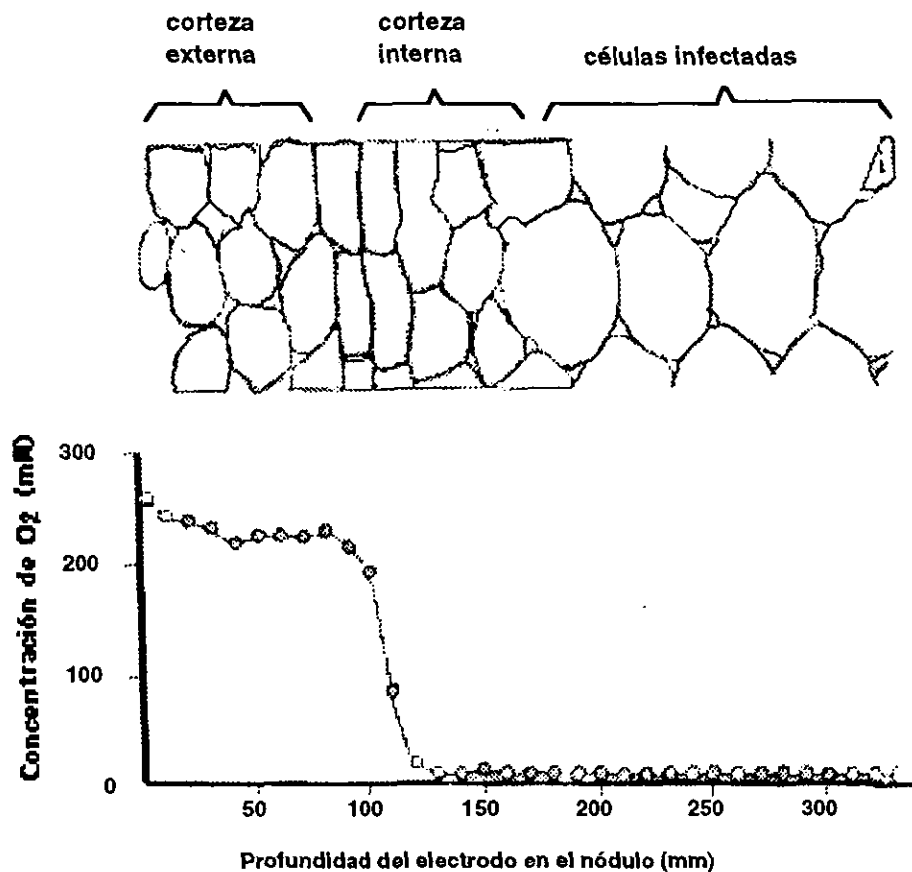


Figura 2. Concentración de oxígeno en las diferentes capas celulares dentro de un nódulo determinado (en Witty et al., 1987)

Cuando las raíces noduladas de soja se exponen a bajas o altas concentraciones de O₂ por largos períodos, los nódulos que se desarrollan presentan una estructura diferente (Parsons y Day, 1990; Dakora y Atkins, 1991). En bajas tensiones de O₂ se desarrollan lenticelas en la superficie del nódulo y se forman espacios intercelulares relativamente grandes en la corteza interna del nódulo. Por otra parte, en nódulos que se someten a tensiones altas de O₂, el desarrollo de lenticelas es casi nulo, y la corteza

interna forma capas de células pequeñas fuertemente empacadas (Layzell *et al.*,1993). De igual forma se reportó que en los nódulos que se desarrollan a una concentración de O₂ del 40% hubo un incremento en el nivel de expresión de una glicoproteína intercelular. Se ha propuesto que esta glicoproteína actúa directamente en la oclusión de los espacios intercelulares (Iannetta *et al.*,1993).

En el caso de los nódulos indeterminados, Soupène *et al.*, (1995) demostraron que existe una disminución gradual de la concentración de O₂ desde el ápice hacia la interzona II y III. Este patrón de concentración de O₂ varía cuando la medición se realiza lateralmente en el nódulo, ya que existe una disminución dramática en la concentración de O₂, al variar de 250 a 1 µM. Este cambio tiene lugar por debajo de la endodérmis, y se cree que la disminución en la concentración de O₂ se debe a la presencia de una barrera en la difusión del O₂. Es claro que esta barrera no existe al nivel del ápice de los nódulos de alfalfa y que el O₂ puede difundir pasivamente desde el exterior hacia la interzona II-III, que es en donde inicia la restricción al paso del O₂ (Soupène *et al.*,1995).

Recientemente, Wycoff *et al.* (1998) reportaron que en los nódulos de alfalfa que se desarrollaron en diferentes concentraciones de O₂ (8, 20 y 50%) no existen diferencias significativas con respecto a la actividad nitrogenasa y la tasa de respiración de dichos nódulos. Además, se detectó la presencia de una glicoproteína similar a la reportada en los nódulos del lupino (Iannetta *et al.*, 1993). Los datos anteriores permiten suponer que la protección de la nitrogenasa por acción de la barrera física es lo suficientemente efectiva para evitar su inactivación, y que bajo condiciones

normales la fijación de N_2 en los nódulos estaría limitada por la difusión del oxígeno hacia el bacteroide.

2.2. La nitrogenasa: sensibilidad por O_2 .

La nitrogenasa es la única enzima que se conoce que es capaz de reducir el N_2 atmosférico. Lo que se conoce como nitrogenasa es un complejo enzimático formado por dos componentes protéicos: la proteína hierro, o Fe-proteína, y la proteína hierro-molibdeno, o FeMo-proteína, las cuales actúan en conjunto y son las responsables de la reducción del N_2 atmosférico en amonio. La reducción catalítica del N_2 por medio de la nitrogenasa comprende a la siguiente serie de reacciones: (i) la reducción de la Fe-proteína por acarreadores de electrones, como las flavodoxinas o ferredoxinas; (ii) la transferencia dependiente de ATP de un electrón de la Fe-proteína a la FeMo-proteína, lo que requiere de la hidrólisis de dos moléculas de ATP por cada electrón que se transfiere; y, (iii) La transferencia de un electrón y un protón al substrato, el cual está unido al cofactor FeMo de la FeMo-proteína. Después de la reducción del N_2 a NH_4^+ , el complejo nitrogenasa se disocia en la Fe proteína y la FeMo-proteína, el ADP se disocia y la Fe-proteína adquiere su conformación inicial, lo que le permite recibir otro electrón y unir otra molécula de ATP para iniciar el ciclo nuevamente. Este ciclo se lleva a cabo ocho veces para que la FeMo-proteína tenga los electrones suficientes para la reducción de 1 mol de N_2 hasta 1 mol de NH_4^+ .

La reducción catalítica del dinitrógeno se indica en la siguiente ecuación:



La reacción requiere de una fuente de electrones y está acompañada por la hidrólisis del ATP a ADP y Pi. Como se puede observar, se requieren 16 moléculas de ATP por cada molécula de N₂ que se fija (Van Kamen, 1995).

La nitrogenasa puede fijar otros sustratos distintos al N₂, que frecuentemente son moléculas pequeñas que contienen un triple enlace. Por ejemplo, esta enzima puede catalizar la reducción de ácido cianhídrico, azidas, óxidos nitrosos y acetileno, entre otros. El acetileno es reducido a etileno, y esta reducción ha sido la base para los ensayos biológicos de la fijación de N₂ (Gallon, 1992).

Como se mencionó con anterioridad, una característica de la fijación biológica de N₂ es ser un proceso altamente sensible al O₂. El complejo enzimático nitrogenasa en la forma pura se inactiva rápidamente y de manera irreversible al ser expuesto al O₂. En condiciones *in vitro*, tanto la Fe-proteína como la FeMo-proteína se inactivan por el O₂; la Fe-proteína es mucho más sensible al O₂ que la FeMo-proteína cuyas vidas medias de inactivación son 30 s y 8 min, respectivamente (Batut y Boistard, 1994). En el caso de la FeMo-proteína, el O₂ provoca un cambio en los estados de oxidación de los centros de Fe, y después de una exposición prolongada la proteína pierde los centros metálicos de Fe, Mo y S (Gallon, 1992).

Por otra parte, en condiciones *in vivo* los microorganismos fijadores de N₂ presentan una amplia variación a la sensibilidad por el O₂, y esto también se da particularmente entre los rhizobia. En los organismos aerobios, como *Rhizobium*, la presencia de O₂ es importante ya que estimula la fosforilación oxidativa, y por lo tanto la generación de ATP para la

síntesis y el funcionamiento de la nitrogenasa. Sin embargo, la concentración de O_2 disuelto que inactiva a la nitrogenasa difiere entre los rhizobia. *Azorhizobium caulinodans* tiene una alta actividad nitrogenasa en cultivos cuando crece en $2 \mu M$ de O_2 (Dreyfus *et al.*, 1983), mientras que los bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* no presentan actividad nitrogenasa en esta concentración de O_2 . Por otra parte, los bacteroides aislados de nódulos de lupino presentan actividad nitrogenasa cuando se aíslan a partir de los nódulos en condiciones aeróbicas. Sin embargo, en los bacteroides de soya aislados de igual forma la actividad nitrogenasa se pierde de manera irreversible (Appleby, 1984). Los bacteroides de *R. leguminosarum* tienen una actividad nitrogenasa óptima a una concentración de O_2 de 800 nM (Laane *et al.*, 1978), mientras que los bacteroides de *B. japonicum* no son activos en esta concentración de O_2 , ya que la actividad máxima de la nitrogenasa se presenta en concentraciones de O_2 que son cercanas a los 100 nM .

2.3. La leghemoglobina y el transporte de O_2 al bacteroide.

Se ha propuesto que después de difundir a través de la barrera cortical el O_2 entra en los espacios intercelulares de la zona central del nódulo, lo que le permite difundir rápidamente hacia la superficie de las células infectadas. Por lo tanto, es probable que exista un gradiente de O_2 insignificante entre la corteza y la superficie de las células infectadas. Esto daría como resultado un gradiente muy bajo entre la concentración de O_2 en la superficie de la célula infectada con respecto a la concentración de O_2 en las bacterias que se localizan en estas células. Los modelos

matemáticos propuestos por Hunt *et al.* (1987) y Sheeby y Bergersen (1987) mostraron que este gradiente no sería lo suficientemente fuerte para proveer el flujo de O₂ que es necesario para la actividad respiratoria de las células bacterianas. Para superar esta limitación en la planta se sintetiza una proteína que une O₂, la leghemoglobina (Lb), cuya función principal es facilitar la difusión del O₂ hacia los bacteroides (Appleby, 1984).

La Lb es una hemoproteína monomérica de peso molecular entre 13 y 20 KD (Fig. 3). A esta proteína se le conoce como leghemoglobina por haberse encontrado por primera vez en los nódulos de la soya (Kubo, 1939) en donde representa del 20 al 30% del total de la proteína soluble del nódulo (Bergersen, 1982).

Una característica particular de las hemoglobinas (Hbs), que incluye a la mioglobina muscular y Lbs de los nódulos de especies leguminosas, es la capacidad para unir el O₂ de manera reversible. Todas las Hbs son proteínas globulares formadas por siete u ocho hélices alfa que se denominan con las letras A a la H. Las Hbs contienen en su estructura un grupo hemo como grupo prostético, el cual es un anillo tetrapirrólico que coordina a un átomo de Fe. El grupo hemo se localiza entre las hélices E y F de las globinas (Fig. 3). Las hélices E y F de las Hbs forman una hendidura que se conoce como el "empaquetamiento del hemo", que es lo suficientemente grande y flexible para permitir la coordinación del Fe del grupo hemo. El átomo de Fe del grupo hemo está coordinado con los cuatro nitrógenos del anillo tetrapirrólico, y en la quinta posición está coordinado con la histidina proximal que se ubica en la hélice F (Fig. 4). El centro de unión del O₂ se encuentra en la sexta posición de coordinación. En la hélice E se ubica la histidina distal que no se une al Fe, pero que participa en la captación de los ligandos por su gran

movilidad (Fig. 4) (Appleby, 1992).

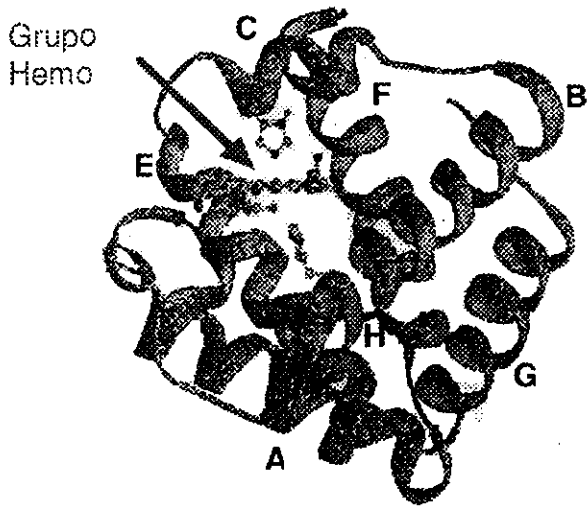


Figura 3. Estructura terciaria de la Lb de soja. Las hélices alfa se indican con las letras A a la H. Tomada de la página electrónica:

<http://bmbsgi11.leeds.ac.uk/promise/GLOBINS.html>

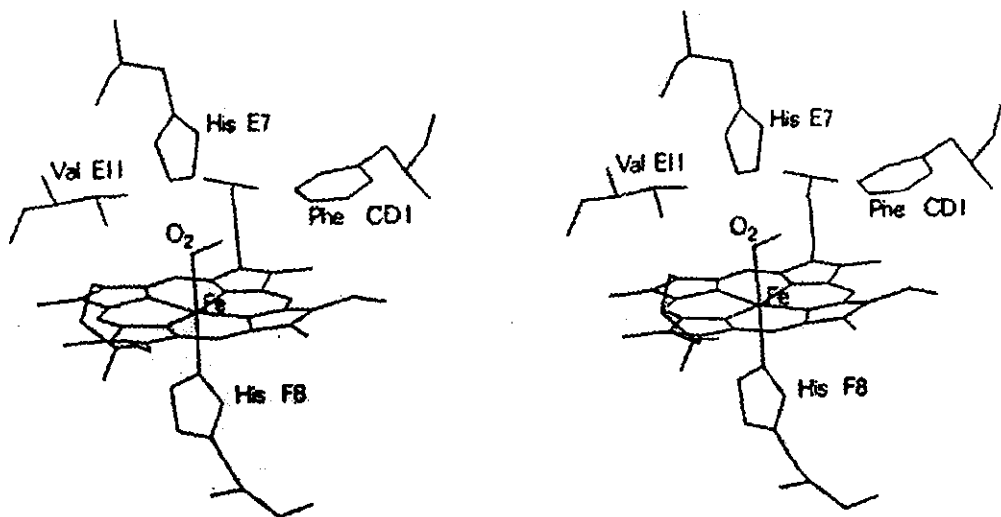


Figura 4. Vista estereoscópica del grupo hemo de una hemoglobina y sitio de unión al O₂ (tomado de Appleby 1992).

La unión del O₂ a la Hb se presenta cuando el Fe del hemo se encuentra en la forma ferrosa, Fe²⁺, y la localización del hemo en el ambiente hidrofóbico de la hendidura que forman las hélices E y F, ayuda a que la oxidación de Fe²⁺ a la forma férrica, Fe³⁺, sea mínima.

La Lb tiene una afinidad alta por el O₂ lo cual resulta de una constante de asociación rápida, y una constante de disociación moderadamente lenta (Gibson *et al.*, 1989). La Lb de la soya tiene una constante de asociación de 120 μM⁻¹ s⁻¹ y una constante de disociación de 5.6 s⁻¹, lo que da como resultado una constante de afinidad de 21.4 μM. Por su parte, la mioglobina del esperma de ballena tiene una afinidad baja por el O₂, 1.9 μM, casi 10 veces menor que la Lba de la soya, ya que la constante de asociación es de 19 μM⁻¹ s⁻¹, y la constante de disociación es de 10 s⁻¹. En la tabla 2 se presentan las constantes cinéticas y la afinidad por O₂ de diferentes hemoglobinas.

En el pasado se propuso que la apoLb era codificada por el genoma de la planta, mientras que el hemo de la Lb era sintetizado por el simbionte bacteriano (Cutting y Schulman, 1969). Sin embargo, los resultados de trabajos recientes permitieron concluir que el hemo de la Lb se sintetiza por la planta (O'Brian, 1996; Santana *et al.*, 1998). Las Hbs, incluyendo a la Lb, citocromos del tipo *b*, catalasas y peroxidasas presentan un protohemo IX como grupo prostético. El protohemo IX se sintetiza a partir del ácido δ-aminolevulínico, ALA, que es el precursor universal de los tetrapirroles a través de 7 reacciones enzimáticas sucesivas. ALA sintasa y la vía C₅ son las rutas involucradas en la formación de ALA (Jahn *et al.*, 1991). La síntesis de ALA, dependiente del glutamato, por la vía C₅ es un proceso de tres

etapas que involucra la participación de un RNA_t en un contexto poco usual (Fig. 5) (Jahn *et al.*,1991) .

Tabla 2. Constantes cinéticas y afinidad por el O₂ de algunas hemoglobinas.

Proteína	¹ K _{on} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	² K _{off} (s ⁻¹)	³ K _D (μM)	Referencia
Mb del esperma de ballena	19	10	1.9	Appleby (1992)
Hb de <i>Vitreoscilla</i>	78	5600	0.0139	Webster (1988)
Leghemoglobina de la soya	120	5.6	21.4	Appleby (1992)
Hb de <i>Parasponia</i>	165	15	11	Bogusz, <i>et al.</i> (1988)
Hb de cebada	9.5	0.027	351.8	Duff, <i>et al.</i> (1997)
AHb1 de <i>Arabidopsis</i>	75	0.12	625	Trevaskis <i>et al.</i> (1997)
AHb2 de <i>Arabidopsis</i>	1.07	0.14	7.64	Trevaskis <i>et al.</i> (1997)
Hb1 del arroz	68	0.038	1789.4	Arredondo-Peter <i>et al.</i> (1997)
Hb de <i>Ascaris</i>	1.5	0.004	375	Goldberg (1995)

¹K_{on} es la constante de asociación al O₂.

²K_{off} es la constante de disociación del O₂.

³K_d es la constante de afinidad de la Hb por el O₂. $K_d = K_{on} / K_{off}$

Por otra parte, se sabe que la expresión de los genes *lb* no sólo son inducidos de manera órgano específica, sino que también se expresan con una secuencia determinada en diferentes tiempos después de la infección por *Rhizobium*.

Las funciones que se han asignado a la Lb son dos: (i) facilitar la difusión del O_2 hacia los bacteroides, y (ii) mantener una reserva de O_2 , o amortiguar la concentración de O_2 dentro del nódulo (Layzell y Hunt, 1990). El trabajo realizado por Wittenberg (1974) fue clave para entender la función de la Lb. Este autor encontró que la adición de Lb a los bacteroides que se habían aislado de la soya resultó en un incremento de 10 veces en la actividad de la nitrogenasa. Melik-Sarkisyan *et al.* (1976) y Bashirova *et al.* (1978) obtuvieron resultados similares al adicionar Lb a bacteroides de *Bradyrhizobium lupini*. Por lo tanto, se ha postulado que la Lb transporta el O_2 a los bacteroides por medio de difusión facilitada. Para que esto pueda llevarse a cabo la Lb debe (i) tener una afinidad alta por el O_2 , (ii) encontrarse en altas concentraciones en el nódulo, y (iii) los bacteroides deben consumir rápidamente el O_2 transportado por la Lb. Se cree que la difusión facilitada del O_2 por la Lb ocurre como sigue: la forma ferrosa de Lb, Lb^{2+} , tiene una afinidad muy alta por el O_2 , por lo que basta una concentración de O_2 disuelto en el citoplasma de tan sólo 48 nM para que el 50% de la Lb se encuentre oxigenada, como LbO_2 . Por otra parte, para que la LbO_2 pueda ceder el O_2 a la cadena respiratoria de los bacteroides, la afinidad de la oxidasa bacteroidal por el O_2 tiene que ser superior en unas 10 veces a la afinidad de la Lb por el O_2 (Becana, 1995). Así pues, la LbO_2 difunde hacia la superficie de la membrana peribacteroidal por un gradiente de concentración, en donde el O_2 será liberado para la respiración del bacteroide. La Lb desoxigenada difundirá por un gradiente de concentración de regreso a la superficie de la célula (Layzell y Hunt, 1990). La síntesis de Lb precede el inicio de la fijación de N_2 (Batut y Boistard, 1994) y el

contenido de Lb en los nódulos de las leguminosas se correlaciona directamente con la capacidad para fijar N₂ (Appleby, 1984).

2.4. Regulación por O₂ de los genes *nif/fix* en *Rhizobium*.

El complejo enzimático nitrogenasa es sensible al O₂ y se inactiva de manera irreversible por la presencia de este elemento. Sin embargo, la actividad de esta enzima requiere de una gran cantidad de ATP, el cual proviene de la fosforilación oxidativa durante el proceso de respiración aeróbica del bacteroide. Lo anterior indica que dentro del nódulo se requiere una concentración baja de O₂, para la fijación de N₂, pero también es necesario el flujo de O₂ para la respiración de la bacteria. A esto se le conoce como "la paradoja del O₂" (Appleby, 1984). Sin embargo, esta paradoja aparente se resuelve con la participación de ambos simbioses.

Existen genes bacterianos que participan en el establecimiento de la simbiosis, entre éstos se incluyen los genes de nodulación, *nod*, y de fijación de N₂, *nif* y *fix*. Los genes *nif* y *fix* se expresan en las últimas etapas del desarrollo del nódulo (Long, 1989). Los genes *nif* rhizobiales son homólogos a los genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*, y se cree que estos genes tienen la misma función en ambos organismos. Por otra parte, los genes *fix* no presentan una contraparte en *K. pneumoniae*, y son esenciales en la fijación de N₂. La tabla 3, muestra los genes *nif* y *fix* identificados en rhizobia y la función que se conoce, o se ha propuesto, para estos genes.

La activación de la transcripción de los genes *nif* y *fix* en *Rhizobium* se realiza en concentraciones bajas de O₂. Bajo estas condiciones se expresan

Tabla 3. Genes *nif* y *fix* Identificados en Rhizobiaceae (tomado de Fischer, 1994)

Gen	Producto y/o función	Sm	Bj	Ac
<i>Genes nif</i>				
<i>nifH</i>	Proteína Fe de la nitrogenasa.	•	•	•
<i>nifD</i>	Subunidad α de la proteína FeMo de la nitrogenasa.	•	•	•
<i>nifK</i>	Subunidad β de la proteína FeMo de la nitrogenasa.	•	•	•
<i>nifE</i>	Biosíntesis del cofactor FeMo.	•	•	•
<i>nifN</i>	Biosíntesis del cofactor FeMo.	•	•	
<i>nifB</i>	Biosíntesis del cofactor FeMo.	•	•	•
<i>nifS</i>	Activación de S para la biosíntesis de centros metálicos.		•	
<i>nifW</i>	Función desconocida. Se requiere para la actividad de la proteína FeMo.			•
<i>nifX</i>	Función desconocida.		•	
<i>nifA</i>	Regulador positivo de los genes <i>nif</i> y <i>fix</i> .	•	•	•
<i>Genes fix</i>				
<i>fixABCX</i>	Función desconocida. Necesario para la función de la nitrogenasa. FixX similar a ferredoxinas.	•	•	•
<i>fixNOQP</i>	Oxidasa terminal simbiótica.	•	•	•
<i>fixGHIS</i>	Bomba de protones acoplada a los procesos redox.	•	•	•
<i>fixL/J</i>	Regulador de dos componentes. Dependiente de O ₂ .	•	•	•
<i>fixK/K2</i>	Regulador positivo de <i>fixNOQP</i> .	•	•	•
<i>fixR</i>	Función desconocida. No es esencial para la fijación de nitrógeno.	•	•	

Abreviaciones: Sm, *Sinorhizobium meliloti*; Bj, *Bradyrhizobium japonicum*; Ac, *Azorhizobium caulinodans*

en la bacteria cadenas de transporte de electrones alternas, cuyas oxidasas terminales tienen una afinidad muy alta por el O₂.

La expresión de los genes *nif* y *fix*, incluyendo los genes estructurales de la nitrogenasa, se pueden inducir *ex planta* bajo condiciones de microaerobiosis (Ditta *et al.*, 1987; Valderrama *et al.*, 1996). Ditta *et al.* (1987) demostraron que la expresión máxima de *nifA* en cultivos de *R. meliloti* se presenta cuando la concentración de O₂ es cercana al 1%. De manera similar, la expresión de *fixK*, *fixNOQP* de *R. meliloti* y *nifH* de *R. etli* se inducen *ex planta* bajo condiciones de microaerobiosis (David *et al.*, 1988; Batut *et al.*, 1989; Valderrama *et al.*, 1996). La inducción de la expresión de los genes *nif* y *fix* a bajas concentraciones de O₂ tiene importancia fisiológica, ya que dentro del nódulo existen condiciones ambientales de baja tensión de O₂, lo que previene la inactivación de la nitrogenasa (Monson *et al.*, 1993).

Los elementos que conforman el esquema de regulación de la expresión de los genes *nif* en rhizobiaceas se obtuvo a partir del estudio de bacterias de los generos *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Azorhizobium*. Aunque los sistemas son similares en los mecanismos generales, también presentan algunas diferencias (Monson *et al.*, 1993). Las condiciones de microaerobiosis son esenciales para la transcripción de los genes *nif* rhizobiales. Sin embargo, por largo tiempo se ha debatido si la reducción de la concentración de O₂ es el único factor que regula la inducción de la expresión de los genes *nif*.

En los nódulos de la alfalfa inmersos en agar, donde disminuye la concentración de O_2 , la expresión de los genes *nif* se induce en las zonas jóvenes del nódulo, presentándose la fijación de N_2 en la zona de prefijación (Soupène *et al.*,1995). Además, se encontró que la expresión simbiótica de los genes de fijación de N_2 en *R. meliloti* es independiente del N_2 disponible en las células bacterianas (David *et al.*,1988). Al igual que en *Klebsiella pneumoniae*, la expresión de los genes *nif* en *Rhizobium* es dependiente de la presencia de las proteínas RpoN y NifA (Merrick, 1992). Sin embargo, los efectores del sistema regulador parecen ser diferentes. En *Rhizobium* la transcripción de los genes *nif* responde sólo a la concentración de O_2 disuelto, y es insensible a la disponibilidad de fuentes de nitrógeno combinado (Ditta *et al.*,1980). Estos resultados permiten establecer que durante el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno la concentración de O_2 es la señal principal de regulación para la transcripción de los genes *nif*.

En *R. meliloti* los genes *fixL* y *fixJ* son los responsables de actuar como sensores de O_2 , y de transmitir la señal al interior de la célula. Los productos de estos genes, FixL y FixJ, pertenecen a un grupo de proteínas reguladoras que se llaman sistemas reguladores de dos componentes (David *et al.*,1988). Los sistemas de dos componentes consisten de una proteína que actúa como sensor, con la cual FixL es homóloga, y una proteína reguladora de la respuesta, con la cual FixJ tiene homología. Con base en la similitud de FixL y FixJ con los sistemas reguladores de dos componentes se propuso un modelo de regulación en cascada de los genes *nif* y *fix* (David *et al.*,1988). FixL es una hemoproteína que actúa como sensor de la concentración de O_2 (Gilles-González *et al.*,1991), y esta proteína responde a la señal activadora al autofosforilarse. Por otra parte, FixJ se activa por la transferencia de un

fosfato que proviene de FixL. Una vez activado, FixJ promueve la transcripción de los genes *nifA* y *fixK*, cuyos productos proteicos se convierten en activadores transcripcionales de al menos 14 genes *nif* y *fix* (Szeto *et al.*,1987; Aguilar *et al.*,1987; Batut *et al.*,1989; Fisher, 1994).

En todas las cepas de *Rhizobium etli* (anteriormente *Rhizobium phaseoli*) caracterizadas a la fecha existen tres copias de los genes *nifH* (Quinto *et al.*,1982), que son los genes estructurales de la nitrogenasa. *R. etli* CE3 tiene tres copias de *nifH* (*nifHa*, *nifHb* y *NifHc*) y su expresión se regula por la concentración de O₂ alcanzando un máximo cuando la concentración de O₂ es del 1% (Valderrama *et al.*, 1996).

2.5 Cadenas respiratorias en *Rhizobium* en vida libre o bacteroides.

La función principal de las cadenas respiratorias en bacterias es el translocamiento de protones a través de la membrana citoplasmática para generar una fuerza motriz que permite la generación de ATP, la movilidad celular y otras funciones dependientes de energía. En la mayoría de los organismos aerobios estrictos o facultativos, la energía necesaria para la actividad metabólica proviene de reacciones de oxido-reducción que catalizan los componentes de la cadena transportadora de electrones. Las cadenas respiratorias bacterianas se constituyen de (i) proteínas Fe-S (deshidrogenasas), (ii) quinonas y (iii) citocromos. La acción enzimática de las deshidrogenasas sobre substratos de carbono deriva en productos reducidos, los cuales transfieren hidrógenos a la poza de quinona/quinol dentro de la membrana citoplasmática. De aquí los electrones pasan hacia las oxidasas terminales que están integradas en la membrana donde se realiza la reducción del O₂. Bajo condiciones aeróbicas, el aceptor final de electrones es el O₂, mientras que el nitrato o fumarato son los aceptores

finales de electrones en condiciones de crecimiento anaeróbico. En las bacterias se conocen dos tipos principales de oxidasas terminales, las quinol oxidasa y las citocromo oxidasas (Poole, 1983). Cuando las bacterias emplean más de una oxidasa terminal la cadena respiratoria se ramifica. La expresión de cadenas respiratorias múltiples con diferentes oxidasas terminales, las cuales difieren en afinidad por el O₂, faculta a las bacterias a contender contra un medio ambiente cambiante (Hennecke, 1993).

La conversión de *Rhizobium* de un estilo de vida libre a un bacteroide endosimbiótico, involucra una serie de cambios en la fisiología de la bacteria, principalmente por el paso de una forma de vida aeróbica a una microaeróbica. Como se mencionó en la sección anterior, *Rhizobium* participa en la resolución de la paradoja del O₂ con la expresión de cadenas respiratorias con diferentes oxidasas terminales, las cuales difieren en su afinidad por el O₂. Esta estrategia faculta a las bacterias para responder a un ambiente microaeróbico, como el que se encuentra dentro del nódulo (Hennecke, 1993).

Se conoce la composición de las cadenas respiratorias de diferentes especies de *Rhizobium*, como en *Azorhizobium caulidonas* (Stam et al., 1984; Kitts y Ludwig, 1994), *Rhizobium etli* (Soberón et al., 1989), *R. leguminosarum* bv *trifolii* (De Hollander y Stouthamer, 1980) *R. leguminosarum* bv *viceae* (Kretovich et al., 1973) y *Bradyrhizobium japonicum* (Hennecke, 1993). En cultivos de vida libre, las especies de *Rhizobium* expresan citocromos de los tipos *b* y *c*, así como las citocromo oxidasas terminales *aa₃* y *o*, las cuales se encuentran ausentes en los bacteroides, en los que se sintetizan los citocromos *c550*, *c552* y *c555* (Batut y Boistard, 1994). En *R. etli* las oxidasas terminales *o* y *aa₃* se identificaron por

espectros de fotodisociación y ensayos de unión al O₂ (Soberón *et al.*,1989). Se ha descrito una tercera oxidasa terminal en *R. etli*, la cual se identificó como un citocromo *d* (Barquera *et al.*,1991). La expresión de las diferentes oxidasas terminales de *R. etli* en condiciones de vida libre está regulada por la concentración de O₂, como se ha reportado para otras especies bacterianas (Poole, 1983). El citocromo *aa*₃ se expresa en cultivos aeróbicos en la fase de crecimiento exponencial, pero su síntesis se reprime bajo condiciones de microaerobiosis en la fase estacionaria, en donde se induce la expresión del citocromo *d* (Barquera *et al.*,1991). En cultivos celulares bajo condiciones de microaerobiosis la expresión del citocromo *o* se reduce en un 50% con respecto a las células cultivadas en condiciones aeróbicas (Barquera *et al.*,1991)

La concentración de O₂ dentro del nódulo es baja. En los nódulos de la soya la concentración de O₂ en las células infectadas está en el intervalo de 3 a 30 nM, lo cual es 10⁻⁴ a 10⁻⁵ veces la concentración de O₂ en la rizosfera (Layzell y Hunt, 1990). En el caso de los nódulos de alfalfa, la concentración de O₂ decrece gradualmente de 250 µM en el ápice del meristemo, a 1 µM en la zona de fijación de N₂ (Soupène *et al.*,1995). Debido a lo anterior, Appleby (1984) pronosticó que en los bacteroides deberían existir oxidasas terminales una afinidad por el O₂ muy alta.

Recientemente se determinó la expresión en los bacteroides de una citocromo oxidasa terminal *cbb*₃ (Hennecke, 1993), la cual permite al bacteroide mantener un metabolismo aeróbico en las condiciones de microaerobiosis dentro del nódulo (Preising *et al.*,1996). Los genes que codifican para esta oxidasa terminal se identificaron como el operón

fixNOQP, y se han reportado genes análogos en *Bradyrhizobium japonicum* (Preising *et al.*,1996), *Rhizobium meliloti* (Kahn *et al.*,1993) y *Azorhizobium caulinodams* (Mandon *et al.*,1994). La oxidasa terminal *cbb₃* actúa en concentraciones bajas de O₂, y tiene una afinidad alta por el O₂ ya que la K_m es de 7 nM, lo cual le permite funcionar en la concentración de O₂ que prevalece en la zona central del nódulo (Preising *et al.*,1996).

2.6. Mecanismos de la regulación de la expresión génica en respuesta a la disponibilidad de O₂.

Como se describió en las secciones anteriores, la participación del microsimbionte en la fijación de N₂ se encuentra fuertemente regulada por la concentración de O₂. Las bacterias anaeróbicas facultativas, y la mayoría de los aerobios obligados, son capaces de adaptarse rápidamente a cambios en la disponibilidad del O₂ dentro de su ambiente. En algunas bacterias entéricas y no entéricas la respuesta adaptativa a cambios en la disponibilidad del O₂ es de mucha importancia. Por ejemplo, tanto la fijación de N₂ y la fotosíntesis anoxigénica son procesos que se encuentran regulados por la concentración de O₂.

Dada la importancia general de la respuesta de adaptación a la limitación de O₂, no resulta sorprendente que existan mecanismos de regulación en diferentes especies bacterianas (revisado por Spiro, 1994). Se han detectado varios sistemas sensor/regulador cuya actividad depende de la concentración de O₂, y que difieren en la forma para detectar el O₂, y transferir la señal. Se conocen dos tipos de sistemas sensor/regulador. El primero, se conoce como el sistema de dos componentes, en el cual la señal

se detecta por una proteína que actúa como sensor y que transfiere la señal a la proteína reguladora por medio de un proceso de fosforilación (Spiro y Guest, 1991). El segundo tipo corresponde a los sistemas de un sólo componente, en donde la señal de percepción y la actividad reguladora suceden en dos dominios de la misma proteína. La transferencia de la señal del dominio sensor al dominio regulador ocurre por medio de un cambio conformacional (Unden *et al.*, 1995). En la tabla 3 se presentan algunos ejemplos de sistemas sensores/reguladores que son dependientes de la concentración de O₂.

Tabla 3. Sistemas sensor/regulador de O₂ y reacciones redox en bacterias
(tomado de Unden *et al.*, 1995)

Sistema Sensor/Regulador	Organismo	Función que regula	Tipo	Cofactor	Posible mecanismo de detección
ArcA/ArcB	<i>Escherichia coli</i>	Catabolismo aeróbico	2 Componentes	?	?
FixL/FixJ	<i>Rhizobium meliloti</i>	Fijación de N ₂	2 Componentes	Hemo	Unión-O ₂ Hemoproteína
FNR	<i>Escherichia coli</i>	Metabolismo anaeróbico	1 Componente	Fe o Fe-S	Reacciones Redox
NifA	<i>B. japonicum</i>	Fijación de N ₂	1 Componente	Fe?	Reacciones Redox (Fe)
SoxRS	<i>Escherichia coli</i>	Estrés Oxidativo (O ₂)	1 Componente	Fe-S	Reacciones Redox
OxyR	<i>Escherichia coli</i>	Estrés Oxidativo	1 Componente	?	Reacciones Redox

i) Sistema Arc.

El sistema Arc ("aerobic respiration control") es un sistema de dos componentes que está compuesto por las proteínas ArcA y ArcB (Iushi y Lin, 1988). La proteína ArcB es un sensor transmembranal capaz de autofosforilarse, a la forma ArcB-P, en respuesta a una limitación de O₂.

ArcB-P cataliza la fosforilación del componente del sistema ArcA. Una vez fosforilado ArcA, ArcA-P adquiere su estado activo al convertirse en un regulador de la expresión genética. En su estado activo, ArcA reprime la expresión de genes del metabolismo aeróbico y activa la expresión de algunos genes del metabolismo anaeróbico (Iushi y Lin, 1993). El mecanismo de detección de O₂ por ArcB permanece desconocido, y en esa proteína no se han detectado grupos prostéticos similares a hemos, quinonas, flavinas, o centros metálicos. ArcB no reacciona directamente con el O₂, sin embargo, al parecer detecta cambios en el estado redox celular (Iushi y Lin, 1993).

ii) Sistema FixL/J.

En rizobia la síntesis de la proteína NifA se regula por los genes *fixLJ*. Los productos de estos genes funcionan de manera similar al sistema Arc (David *et al.*, 1988). FixL y FixJ son miembros de los sistemas reguladores de dos componentes, por medio de los cuales la bacteria es capaz de responder a señales externas o citoplásmicas (Ronson *et al.*, 1987). FixL es una hemoproteína con actividad de cinasa y fosfatasa que contiene un grupo hemo localizado en el dominio central de la proteína, y que actúa directamente como sensor de la concentración de O₂. El dominio C-terminal de esta proteína es el dominio más conservado en las proteínas que actúan como sensores en este tipo de sistemas y contiene el sitio de autofosforilación de FixL. Una vez que FixL se ha fosforilado, transfiere a su vez el fosfato al dominio N-terminal de la proteína FixJ. En el estado no fosforilado de FixJ, existe un arreglo en el cual el dominio C-terminal, con una región de unión a DNA, se encuentra cubierto por el dominio N-terminal (Kahn y Ditta, 1991). La fosforilación del dominio N-terminal de FixJ por FixL induce un cambio conformacional de la proteína exponiendo el dominio C-

dando como resultado que el centro metálico Fe-S se transforme en un centro metálico de tipo $[2\text{Fe-2S}]^{+2}$ causando la inactivación de la proteína (Khoroshilova *et al.*, 1997). Por lo tanto, cuando FNR tiene el centro metálico $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ funciona como sensor debido a su extrema sensibilidad al O_2 (Lazazzera *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997). La figura 6 muestra el mecanismo para la actividad de FNR, así como un modelo del monómero de esta proteína.

Los sistemas que se regulan por la concentración de O_2 , con analogía al sistema FNR de *E. coli* son poco comunes, sin embargo, se han caracterizado sistemas similares en distintos grupos taxonómicos, particularmente en miembros de las Pseudomonadaceae y Rhizobiaceae (Tabla 4) (Spiro, 1994) .

iv) Sistema FixK.

En los diazótrofos simbióticos de la familia Rhizobiaceae la expresión de los genes para la fijación de N_2 se regula por un mecanismo en cascada que involucra a proteínas semejantes a FNR. Dentro de estas proteínas se encuentra FnrN y FixK. FnrN se encuentra presente en *Rhizobium leguminosarum* (Colonna-Romano *et al.*, 1990; Schlüter *et al.*, 1992), la cual es funcionalmente similar a FixK. Sin embargo, FnrN parece ser sensible al O_2 y actúa de manera similar a FNR (Schlüter *et al.*, 1992).

FixK es una proteína común en los rhizobia, la cual activa la expresión del gen *fixN* que es necesario para la fijación de N_2 (Batut *et al.*, 1989; Anthamatten *et al.*, 1992; Kaminski *et al.*, 1991).

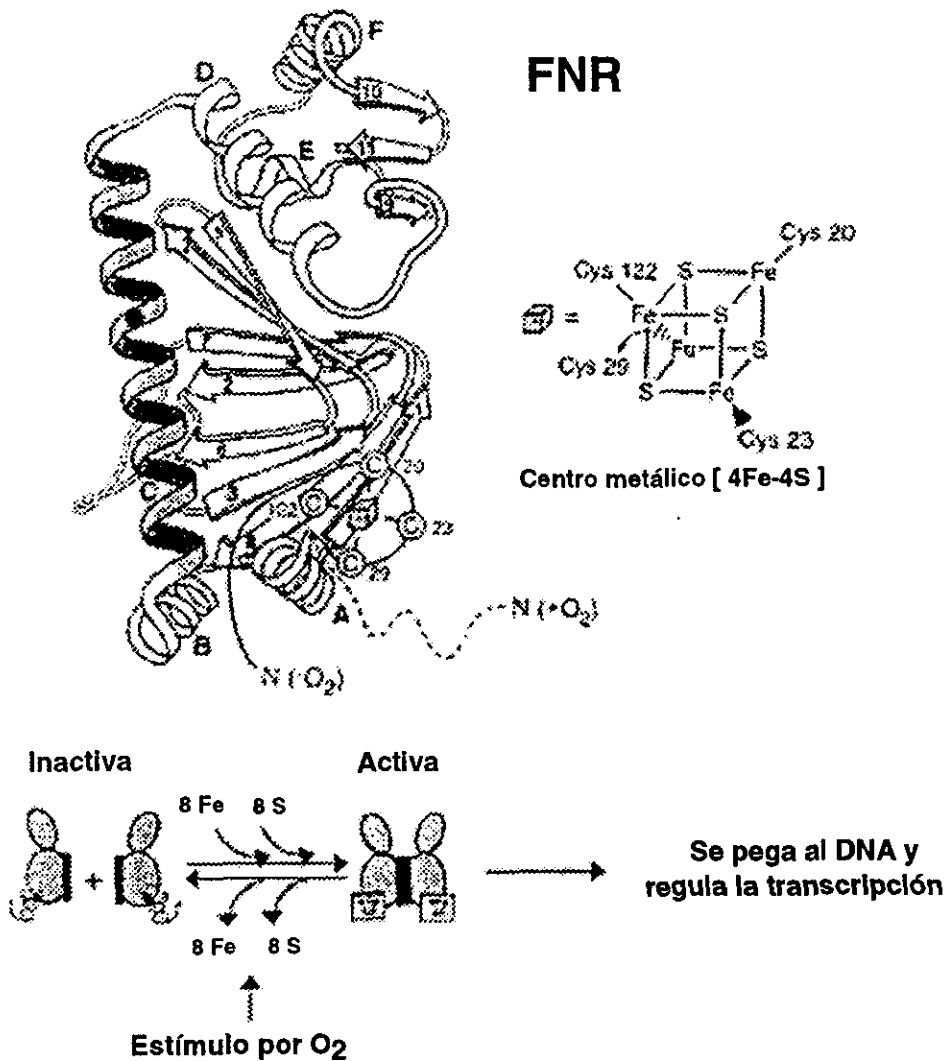


Figura 6. Modelo hipotético de un monómero de FNR con base a su similitud con CAP, que muestra el mecanismo de acción de FNR (tomado de Lazazzera *et al.*, 1996).

Tabla 4. Proteínas homólogas a FNR (tomado de Spiro, 1994).

Proteína	Organismo	Función
EtrA	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Respiración anaeróbica
FNR	<i>Vibrio fischeri</i>	Luminiscencia
HlyX	<i>Actinobacillus pleuroneumonide</i>	Biosíntesis de hemolisina?
BTR	<i>Bordetella pertussis</i>	Biosíntesis de hemolisina?
ANR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Denitrificación
FnrA	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Fermentación de arginina
FixK	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Fijación de N ₂
FnrN	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Fijación de N ₂
FixK	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Fijación de N ₂
FixK	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Fijación de N ₂
Producto orf4	<i>Rhizobium 1C3342</i>	Desconocida
AaDR	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Metabolismo ác. aromaticos
FLP	<i>Lactobacillus casei</i>	Desconocida

En *Sinorhizobium meliloti* FixK actúa como regulador positivo del operón *fixNOQP*, y regula de manera negativa su propia expresión y la de NifA (Batut y Boistard, 1994); mientras que en *A. caulinodans* se requiere FixK para la regulación positiva de la expresión de *nifA* (Kaminski *et al.*, 1991). La síntesis de FixK es mayor cuando la tensión de O₂ es baja, y está regulada por el sistema FixL/J. Por lo tanto, mientras el control de la expresión de los genes *nif* por O₂ se ejerce al nivel de FixLJ y NifA, es posible que el control por O₂ de la expresión de *fixNOQP* esté mediado sólo por la regulación de FixK. Otra posibilidad es que la proteína FixK pudiera actuar como sensor de una señal reguladora diferente al O₂ y aún no identificada (Miranda *et al.*, 1996). Aunque FixK y FNR son similares a lo largo de sus secuencias, los residuos de cisteínas presentes en el extremo amino-terminal, que son los responsables de la sensibilidad al O₂ en FNR, no se encuentran en FixK.

En *Rhizobium etli* se ha demostrado la presencia de un gen *fixL* muy particular ya que no se presenta un gen homólogo estructural de *fixJ*. En microaerobiosis FixL* y FixK son reguladores de otros genes *nif*. En condiciones de vida libre, FixL* controla la expresión de *fixK* que a su vez regula la expresión de los genes *fixN*. Los genes *fixN*, que se encuentran reiterados, se regulan diferencialmente lo que sugiere la participación de otros elementos regulatorios. Durante la simbiosis los genes *fixL** y *fixK* no son requeridos para la fijación de nitrógeno, sugiriendo que la expresión de un gen *fixN* funcional para fijar nitrógeno es diferente a la de vida libre (Girard, comunicación personal).

3. La hemoglobina de *Vitreoscilla* sp. y su uso biotecnológico.

Por mucho tiempo se pensó que las Hbs estaban presentes sólo en los animales. Sin embargo, el transporte de O₂ por medio de hemoproteínas es una función biológica extensa que se ha identificado también en las plantas (Landsmann *et al.*, 1986), hongos (Zhu y Riggs, 1992), protozoarios (Takagi, 1993) y bacterias (Wakabayashi *et al.*, 1986; Vasudevan *et al.*, 1991; Cramm *et al.*, 1994; Favey *et al.*, 1995; LaCelle *et al.*, 1996), lo que indica que las Hbs se encuentran ampliamente distribuídas en los organismos (Hardison, 1996).

Como se mencionó anteriormente, durante el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno se expresa una Lb por parte de la planta, cuya función es transportar O₂ al bacteroide para su actividad respiratoria. Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado la presencia de una Hb en los rhizobia.

En el caso de las Hbs bacterianas, la Hb que se aisló primero, y que se ha caracterizado mejor, es la Hb de la bacteria *Vitreoscilla* (Wakabayashi *et al.*, 1986; Dikshit y Webster, 1988). *Vitreoscilla* es una bacteria filamentosa Gram-negativa, miembro de la familia Beggiatoa, que se clasifica dentro de la subdivisión β de las bacterias púrpuras fotosintéticas (Wakabayashi *et al.*, 1986; Woese *et al.*, 1984). *Vitreoscilla* es un aerobio obligado, aunque crece en hábitats pobres en O₂, tales como las charcas estancadas o en la materia vegetal en estado de putrefacción. Cuando esta bacteria crece en condiciones de hipoxia se induce la síntesis de una Hb. La Hb de *Vitreoscilla*, VHb, consta de dos subunidades idénticas, con una masa molecular de 15,775 Da y 2 protohemos (Tyree y Webster, 1978). Dadas las características espectrales de VHb, inicialmente se pensó que se trataba de una oxidasa

terminal soluble, la cual se identificó como un citocromo *o* (Webster y Liu, 1974). Sin embargo, esta proteína genera formas oxigenadas, relativamente estables, que presentan señales espectrales que son similares a Hbs en la forma oxigenada (Webster y Liu, 1974). La forma oxigenada de VHb presenta una tasa de disociación rápida, con respecto a otras Hbs (Orii y Webster, 1986) (Tabla 2). La secuencia de amino ácidos de esta proteína ha sido determinada, y tiene similitud con otras Hbs (Wakabayashi *et al.*, 1986), sin embargo, la mayor similitud es con las Hbs microbianas. Por otra parte, recientemente se determinó la estructura tridimensional de VHb, la cual presenta un arreglo similar a las Hbs animales y vegetales (Fig. 7) (Tarricone *et al.*, 1997).

El gen que codifica para la VHb se clonó y secuenció (Dikshit y Webster, 1988; Khosla y Bailey, 1989). El gen *vhb*, incluyendo al promotor, tiene una longitud de 1.4 kb y se localiza dentro del cromosoma de la bacteria. Este gen está presente en una sola copia en el genoma de *Vitreoscilla*, y el transcrito específico de *vhb* es de aproximadamente 500 bases lo cual concide con el péptido codificado por *vhb*, que es de 146 residuos de amino ácidos (Dikshit y Webster, 1988). El gen *vhb* se expresó en *E. coli* bajo el efecto de su propio promotor (Dikshit y Webster, 1988; Khosla y Bailey, 1989). En *E. coli* el nivel de RNAm de *vhb* es mayor en concentraciones de O₂ del 2% (Dikshit y Webster, 1988; Khosla y Bailey, 1989; Dikshit *et al.*, 1990).

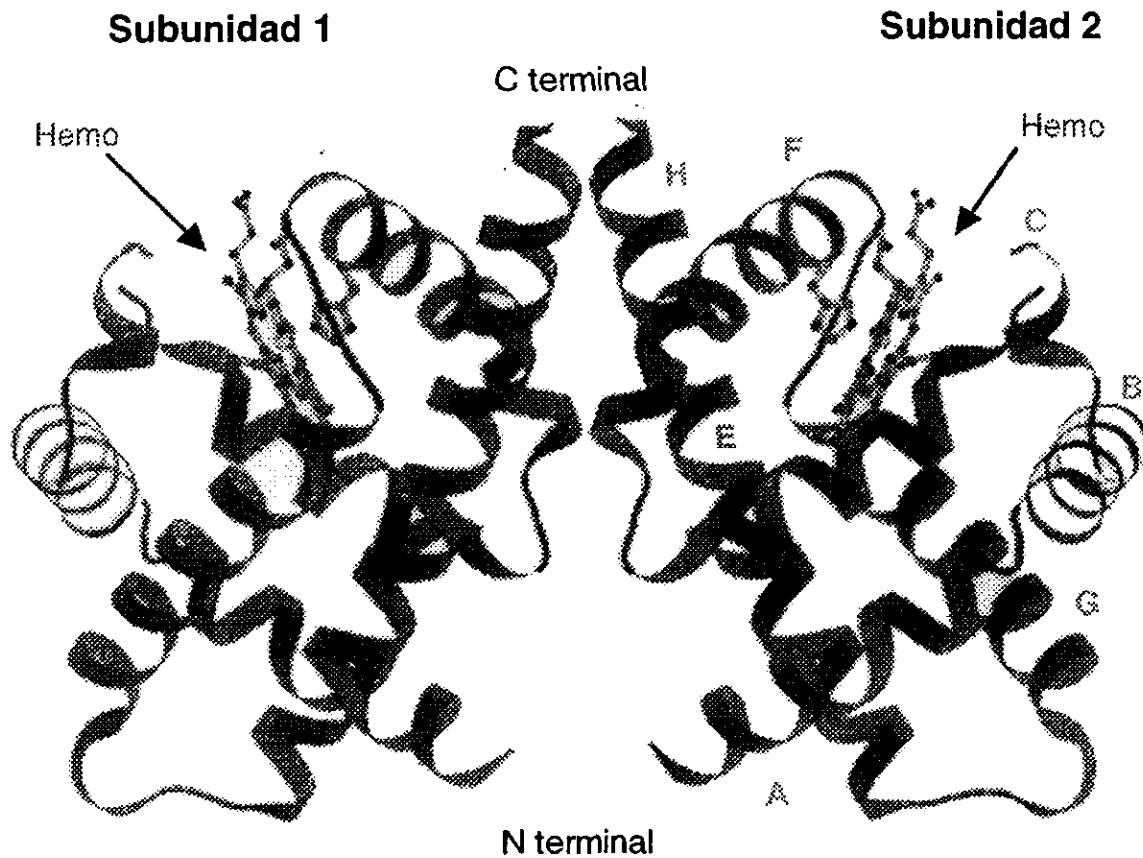


Figura 7. Estructura terciaria de VHb, en su forma dimérica mostrando el arreglo típico de las globinas y las alfa hélices que la constituyen (tomado de Tarricone *et al.*, 1997).

Con la finalidad de establecer como se regula la actividad del gen *vhb*, éste se introdujo en huéspedes heterólogos Gram-negativos, tal como *E. coli*, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* y *Azotobacter vinellandi* (Dikshit *et al.*, 1990; Joshi y Dikshit, 1994). En estos casos la actividad del promotor de *vhb* se determinó por el nivel de expresión de VHb y los productos de la fusión *vhb*-gen reportero bajo diferentes concentraciones de O₂. La

expresión del gen *vhb* varió en los diferentes huéspedes, ya que se observó un incremento de 10 a 50 veces en la síntesis de VHb y los productos del gen reportero cuando la concentración de O₂ disuelto fue menor al 5% (Joshi y Dikshit, 1994). Esta variación en los niveles de expresión del gen *vhb* refleja la diferencia que existe en las señales de transcripción y traducción entre las diferentes bacterias Gram-negativas. Sin embargo, la inducción microaeróbica del promotor *vhb* en los diferentes huéspedes se debe a la presencia de un mecanismo de activación común que depende del O₂. El análisis de la secuencia del promotor del gen *vhb* indica la presencia de un sitio de unión para FNR (Joshi y Dikshit, 1994). Los mismos autores demostraron que este gen no se activa en cepas de *E. coli fnr-* bajo condiciones de microaerobiosis, lo cual sugiere que en la regulación de la transcripción de *vhb* participa FNR.

Existen reportes sobre la modificación del metabolismo aeróbico en diferentes organismos debido a la presencia de VHb (Tabla 5). En condiciones de microaerobiosis las cepas de *E. coli* que sintetizan VHb crecen en densidades mayores (Khosla *et al.*,1990). Esto pudiera deberse a que VHb recombinante incrementa la difusión facilitada del O₂ disuelto en estas condiciones, y de esta forma cambia la actividad de las oxidasas terminales, lo que causa el incremento en la síntesis del ATP (Kallio *et al.*,1994; Khosla *et al.*,1990). Magnolo *et al.* (1991) reportaron modificaciones en el metabolismo aerobio debido a la expresión de *vhb* en *Streptomyces coelicolor* y *S. lividans*. En ambas cepas el gen de *vhb* se clonó con su promotor nativo y se detectó la presencia de VHb. En *S. coelicolor* que expresó VHb la producción de actinorodina, que es un policétido aromático, aumentó 10 veces cuando la concentración de O₂ disminuyó, con respecto a

la cepa control que carecía del gen *vhb*. Por otra parte, *S. lividans*, crece en altas densidades al sintetizar VHb (Magnolo *et al.*,1991). En *Acremonium chrysogenum* la presencia intracelular de VHb incrementó la síntesis global de proteínas, además de mejorar la producción de cefalosporina C y afectar diversas rutas metabólicas del metabolismo de carbono y nitrógeno (De Modena *et al.* 1993).

Tabla 5 .- Efecto de la hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb) en el metabolismo de diferentes organismos.

Organismo	Efecto	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Aumento en la tasa de crecimiento y densidad celular	Khosla y Bailey 1988
<i>Escherichia coli</i>	Aumento en la producción de proteínas recombinantes	Khosla <i>et al.</i> 1990
<i>Escherichia coli</i>	Crecimiento de mutantes en oxidasas terminales	Dikshit <i>et al.</i> 1992
<i>Escherichia coli</i>	Aumento en la síntesis de ATP y tasa de crecimiento	Tsai <i>et al.</i> 1996a
<i>Escherichia coli</i>	Redirección en el metabolismo del carbono	Tsai <i>et al.</i> 1996a
<i>Escherichia coli</i>	Aumento en la actividad de oxidasas terminales	Tsai <i>et al.</i> 1996b
<i>Escherichia coli</i>	Aumento en el flujo metabólico	Chen <i>et al.</i> 1994
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aumento en la producción de alcohol	Chen <i>et al.</i> 1994
<i>Streptomyces lividans</i>	Aumento en la tasa de crecimiento	Magnolo <i>et al.</i> 1991
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Aumento en la producción de actinoridina	Magnolo <i>et al.</i> 1991
<i>Nicotiana tabaccum</i>	Germinación, crecimiento y producción de nicotina	Holmberg, <i>et al.</i> 1997
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Aumento en la producción de cefalosporina C	DeModena <i>et al.</i> 1993

Aunque la presencia de VHb provoca cambios metabólicos significativos durante el crecimiento aeróbico de los organismos, el mecanismo de acción de VHb no es del todo conocido (Joshi y Dikshit, 1994). En comparación con otras Hbs, VHb presenta una afinidad baja por el O₂ con una K_d de 6 μM (Tabla 2). La alta constante de disociación del O₂ de VHb permite suponer que VHb libera rápidamente el O₂. Con base en estos datos, y en resultados que se obtuvieron al expresar VHb en *E. coli*, Bailey (1995) propuso una hipótesis que explica el modo de acción de VHb en *E. coli*. Su hipótesis establece que cuando VHb se encuentra presente, la concentración efectiva de O₂ disuelto en la célula es igual a la suma de la concentración de O₂ disuelto más la concentración de VHb oxigenada. De esta manera, cuando hay expresión de VHb la célula presenta una oxigenación interna mayor con respecto a la concentración de O₂ del ambiente externo. Recientemente se expresaron en *E. coli* la flavohemoglobina de levadura y la mioglobina del corazón de caballo. Las células transformadas se crecieron en condiciones limitantes de O₂, y los resultados permitieron concluir que VHb es significativamente más eficiente para permitir el crecimiento celular bajo condiciones de hipoxia, con respecto a las Hbs de levadura y caballo (Kallio *et al.*, 1996).

El gen *vhb* se introdujo y expresó en plantas de tabaco (Holmberg *et al.*, 1997). Las plantas transgénicas de tabaco, que expresaban VHb, desarrollaron casi el doble del peso seco con respecto a las plantas control. Aparentemente, este aumento está asociado con un incremento de 30 a 40 % en el contenido de clorofila en las plantas transgénicas. Estos resultados sugieren que la actividad metabólica de las células vegetales podría estar limitada por O₂, y que la presencia de VHb tendría un efecto positivo en el

desarrollo y productividad de las plantas bajo ciertas condiciones de crecimiento (Holmberg *et al.*,1997).

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

Como se mencionó previamente, el O_2 es un factor fundamental en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno. La planta aporta una fuente de energía a la bacteria (malato o succinato), y a cambio ésta reduce el nitrógeno atmosférico a NH_4^+ , el cual es utilizado por la planta para la síntesis de amino ácidos, proteínas y otras moléculas nitrogenadas. La nitrogenasa es la enzima responsable de la fijación de N_2 , es una proteína sensible al O_2 y en las plantas leguminosas existen mecanismos que protegen la nitrogenasa. Los nódulos presentan mecanismos para la regulación de la permeabilidad del O_2 (Appleby, 1984; Witty et al, 1987; Hunt y Layzell, 1993). En las células infectadas de los nódulos la concentración de O_2 es baja, entre 5 y 50 nM, con respecto a las células que se encuentran en presiones normales de O_2 , aproximadamente 250 μM (Kuzma et al., 1993).

Entre estos mecanismos el que destaca es la síntesis de una hemoproteína por parte de la planta, la Lb, cuya función es proveer de O_2 al bacteroide para su actividad respiratoria (Appleby, 1984). Desde hace más de 30 años se ha especulado que los bacteroides se encuentran limitados por la disponibilidad del O_2 , lo cual repercutiría en la reducción en la tasa de respiración aeróbica con la consecuente disminución en la síntesis de ATP, que es indispensable para la actividad de la nitrogenasa (Bergersen, 1962; Wittenberg, 1974; Werner, 1992).

En el presente trabajo, se plantéo valorar el efecto fisiológico debido a la expresión de una hemoglobina presente en el microsimbionte, tanto en vida libre como en simbiosis. A la fecha no existen reportes de la síntesis de

FALTA PAGINA

No.

44

Los objetivos de este trabajo fueron:

•Objetivos Generales:

- Clonar y expresar en *Rhizobium etli* el gen heterólogo de hemoglobina de *Vitreoscilla*.
- Analizar el efecto de la expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla* en *Rhizobium*, tanto en vida libre como en simbiosis.

•Objetivos particulares:

- En vida libre
 - * Determinar la presencia de VHb en *Rhizobium etli*.
 - * Determinar el efecto de la presencia de VHb en la actividad respiratoria de *Rhizobium etli*.
 - * Cuantificar la expresión de un gen de fijación de N₂, *nifHc*, en condiciones de microaerobiosis cuando se expresa VHb.

- En simbiosis

Analizar el efecto de la expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla* en la simbiosis *R. etli*-frijol (*Phaseolus vulgaris*) determinando:

- * Nodulación.
- * Actividad nitrogenasa.
- * Contenido total de N₂ en el follaje y las semillas.
- * Desarrollo de las plantas

El cumplimiento de estos objetivos nos permitirá saber si VHb funciona como un transportador de O₂ cuando se sintetiza por la bacteria, y si esto representa una ventaja en la fijación simbiótica de N₂.

III. Materiales y Métodos; Resultados:

ARTICULO

Rhizobium etli genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin: effects on free-living and symbiosis.

Rhizobium etli Genetically Engineered for the Heterologous Expression of *Vitreoscilla* sp. Hemoglobin: Effects on Free-Living and Symbiosis

Marlo Ramírez,¹ Brenda Valderrama,² Raúl Arredondo-Peter,¹ Mario Soberón,² Jaime Mora,¹ and Georgina Hernández¹

¹Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A; ²Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 520-3, Cuernavaca, Morelos, México

Accepted 14 July 1999.

Oxygen concentration is an environmental signal that regulates nitrogen fixation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. We investigated the effect of the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin (VHb), which is an oxygen-binding protein, in *Rhizobium etli*. The *vhb* gene and its native promoter were subcloned in the plasmid pMR4 and transformed into the *R. etli* strain CE3. Free-living cultures of engineered *R. etli* CE3 expressed the *vhb* gene, as shown by the CO-difference spectral and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analyses of cell extracts. The expression of *vhb* in free-living *R. etli* grown under most limiting oxygen concentrations resulted in an increase in respiratory activity, chemical energy content, and expression of the nitrogen-fixation gene *nifHc*. Bacteroids isolated from nodules of bean plants inoculated with the engineered *R. etli* CE3 expressed the *vhb* gene, as shown by RNA slot-blot analysis. Bean plants inoculated with the engineered strain exhibited higher nitrogenase activity and total nitrogen content (68% and 14 to 53%, respectively) than bean plants inoculated with the *R. etli* wild type. These results suggest that the synthesis of VHb in engineered *R. etli* stimulated the respiratory efficiency of free-living rhizobia, and also probably of symbiotic bacteroids, thus leading to higher levels of symbiotic nitrogen fixation.

Additional keywords: bacterial Hbs, rhizobial nitrogen fixation.

Rhizobia may live either aerobically in the soil or microaerobically in the internal environment of the root nodules of legume plants, where fixation of atmospheric nitrogen occurs. Oxygen concentration is a critical factor that regulates essential processes in the endosymbiotic rhizobia, such as nitrogen fixation and respiration (Batut and Boistard 1994). The apparent paradox of a low oxygen concentration that is required for nitrogen fixation and a high oxygen supply that is

required for bacteroid respiration is satisfied by the cooperation of both symbiotic partners (Batut and Boistard 1994; O'Brian and Maier 1989). In determinate nodules, such as those from soybean and bean plants, a physical cortical barrier exists that limits the diffusion of gases (Layzell and Hunt 1990). Oxygen concentration in the infected cells is about three orders of magnitude lower than the oxygen concentration in the rhizosphere (Layzell and Hunt 1990; Soupène et al. 1995). In nodules, facilitated diffusion of oxygen by leghemoglobin (Lb), a plant protein with high affinity for oxygen, is required to provide the necessary oxygen flux to the actively respiring bacteroids (Appleby 1984; O'Brian and Maier 1989). It has been shown that the addition of Lb to isolated bacteroids results in a 10-fold increase in nitrogenase activity and a twofold increase in the rate of oxygen uptake (Wittenberg et al. 1974).

Oxygen concentration is an important environmental signal that regulates the expression of *nif* genes, which are involved in rhizobial nitrogen fixation (Fischer 1994). In *Rhizobium meliloti*, transcription of *nif* genes is induced in oxygen-depleted conditions under the control of the two-component regulatory system FixL/J. FixL is a membrane oxygen-binding protein that autophosphorylates in the deoxygenated form, and that transmits a signal to FixJ via phosphorylation-dephosphorylation reactions (Gilles-Gonzalez et al. 1991). Further, in the phosphorylated (active) form FixJ will activate NifA protein, which is a transcriptional activator of the *nif* operon. In addition to the *R. meliloti* FixL/J system, a number of oxygen-sensing/regulating proteins have been described, such as Fnr and ArcA, that activate microaerobic metabolism in bacteria growing at low oxygen concentrations (Spiro and Guest 1991).

It is not known if hemoglobins (Hbs), oxygen-binding proteins, exist in rhizobia. However, Hbs have been found in bacteria (Hardison 1998). Although little is known about the function of bacterial Hbs, some bacterial species synthesize Hbs under hypoxic conditions, and thus it is likely that under these conditions some species use Hbs for delivery of oxygen as the terminal electron acceptor (Hardison 1998). The first known, and a thoroughly studied, bacterial Hb was isolated from a *Vitreoscilla* sp. (Wakabayashi et al. 1986). Because the synthesis of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin (VHb) increases un-

Corresponding author: Georgina Hernández; Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México; Telephone or Fax: +52 (73) 11 67 10; E-mail: gina@cihn.unam.mx

der hypoxic conditions, it has been postulated that the function of Vhb is to bind and transport oxygen for the bacterial metabolism in microaerobic environments (Webster 1987). The gene that codes for Vhb has been cloned and sequenced (Dikshit and Webster 1988; Koshla and Bailey 1988), and the *vhb* gene together with the native promoter has been expressed in heterologous microbial hosts, such as *Escherichia coli* (Dikshit et al. 1990; Koshla and Bailey 1988), *Serratia marcescens* (Wei et al. 1998), *Streptomyces coelicolor* and *S. lividans* (Magnolo et al. 1991), *Acremonium chrysogenum* (DeModena et al. 1993), and *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et al. 1994), as well as in the plant host *Nicotiana tabacum* (Holmberg et al. 1997). Effects resulting from the modification of aerobic metabolism by transgenic Vhb, such as increased cell densities, protein synthesis, and secondary metabolite production, have been reported for engineered *E. coli* and fungi (Koshla and Bailey 1988; Koshla et al. 1990; Khosravi et al. 1990; DeModena et al. 1993; Magnolo et al. 1991). Transgenic tobacco expressing *vhb* showed enhanced plant growth, reduced germination and flowering time periods, and higher chlorophyll and nicotine content (Holmberg et al. 1997).

Because the expression of *nif* genes and the efficiency of nitrogen fixation depend on the concentration of oxygen, we were interested in studying the effect of the heterologous expression of Vhb in *R. etli*, both in free-living conditions and in symbiosis with beans. Our results showed that engineered *R. etli* expressing Vhb had enhanced respiration rates and *nif* gene expression under low oxygen concentration. Also, engineered rhizobia exhibited higher nitrogenase activity during symbiosis, and nodulated plants exhibited higher total nitrogen content in foliage and seeds.

RESULTS

Expression of *vhb* in free-living *R. etli* CE3.

To express the *Vitreoscilla* sp. *vhb* gene in *R. etli* CE3, a 2.2-kb fragment from the plasmid pUC8:15 containing the *vhb* gene and its native promoter was subcloned into the stable vector pTR101 (Davis et al. 1992; Weinstein et al. 1992), thus generating the pMR4 plasmid. Plasmid pMR4 was conjugated to *R. etli* CE3 and was >99% stable when transconjugants were grown on PY or minimal medium without selection. Moreover, in contrast to the white color of the cell pellet of the *R. etli* CE3 wild type, the cell pellet of *R. etli* CE3/pMR4 had a reddish color after centrifugation of liquid cultures, which suggested that the *vhb* gene was expressed in the transformed cells.

The *Vitreoscilla* sp. *vhb* gene, regulated by its own promoter, has been expressed in heterologous bacterial hosts (Dikshit et al. 1990; Koshla et al. 1990; Magnolo et al. 1991). In order to determine whether the *vhb* gene was expressed in free-living *R. etli* CE3/pMR4, slot-blot analysis was performed with the bacterial RNA as template and the *vhb* gene as probe. The Vhb transcript was detected in *R. etli* CE3/pMR4 cells grown in microaerobic liquid cultures, and no hybridization signal was detected in the control wild-type strain *R. etli* CE3 (Fig. 1).

The synthesis of Vhb protein in engineered bacteria has been confirmed by obtaining the differential spectra (CO-dithionite reduced versus dithionite reduced) of cell extracts.

Characteristic signals of Vhb in CO-differential spectra have been reported with absorption maxima at 419, 532, and 570 nm and troughs at 436 and 554 nm (Webster and Liu 1974; Tyree and Webster 1978). In order to test for the presence of Vhb in *R. etli* CE3/pMR4, CO-differential spectra of cell extracts were obtained. Protein samples obtained from *R. etli* CE3 and CE3/pMR4 strains (see Materials and Methods) were reduced with dithionite, bubbled with CO, and the CO-differential (CO-reduced versus reduced) spectra were obtained. As a positive control, CO-differential spectra of partially purified Vhb were also obtained. The resulting CO-differential spectra showed differences between *R. etli* CE3/pMR4 (engineered) and CE3 (wild-type) strains (Fig. 2A). The CO spectrum of *R. etli* CE3/pMR4 showed maxima at 418, 534, and 567 nm and troughs at 436 and 551 nm, which are quite similar to peaks and troughs of the CO spectrum obtained for the partially purified Vhb (Fig. 2A). In contrast, the CO spectrum of the wild-type *R. etli* CE3 showed a small peak at 421 nm and a trough at 439 nm, which are different from the values observed for the *R. etli* CE3/pMR4 and Vhb CO spectra. These results indicated that Vhb had been synthesized in *R. etli* CE3/pMR4, which was further confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis. Figure 2B shows that a protein that co-migrates with the native Vhb in a polyacrylamide gel had been synthesized in *R. etli* CE3/pMR4 but not in *R. etli* CE3.

Respiratory activity and chemical energy content in free-living *R. etli* CE3/pMR4.

It has been proposed that the expression of Vhb in *E. coli* improves the efficiency, rather than the rate, of respiration under microaerobic conditions by increasing the amounts of dissolved oxygen and the efficiency of ATP production (Kallio et al. 1994). To determine the respiratory efficiency of engineered rhizobia, we evaluated the succinate oxidase activity of *R. etli* CE3 and CE3/pMR4 cells grown in microaerobic liquid cultures. Figure 3 shows that, when cultured microaerobically, *R. etli* CE3/pMR4 has two- to threefold higher respiratory rates than the *R. etli* CE3 wild-type strain. Moreover, we de-

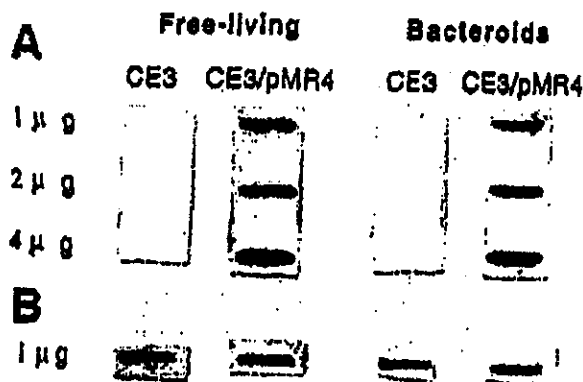


Fig. 1. Slot-blot analysis of free-living *Rhizobium etli* RNA hybridized with the *vhb* gene probe. *R. etli* CE3 and CE3/pMR4 free-living cells were grown at 0.5% oxygen; bacteroids were isolated from 18-day-post-inoculation nodules. The RNA concentration loaded in each slot is indicated. A, 32 P-labeled *vhb* gene from pUC8:15 or (B) 16S rRNA gene fragment from pKK3535 were used as the experimental and control probes, respectively.

terminated the ATP, ADP, NADH, and NADPH content in *R. etli* CE3 and CE3/pMR4 cells grown in microaerobic liquid cultures, and results showed that the nucleotide content was higher in *R. etli* CE3/pMR4 than in *R. etli* CE3 wild-type strain (Table 1). The observed increase in total chemical energy was 23, 82, and 69% at 0.25, 0.5, and 1% oxygen, respectively, relative to the wild-type strain (Table 1).

Activity of *nifHc* in free-living *R. etli* DEM233/pMR4.

All *R. etli* strains characterized so far have three genes encoding nitrogenase reductase (*nifH*), denoted *nifHa*, *nifHb*, and *nifHc* (Quinto et al. 1985). The ex planta expression of *nifHa* and *nifHc* in *R. etli* is induced by microaerobiosis in minimal medium cultures (Valderrama et al. 1996). In microaerobic cultures and bean nodule bacteroids the *nifHc* gene is expressed at higher levels than the *nifHa* gene (Valderrama et al. 1996). To evaluate the effect of Vhb on the ex planta expression of *nifHc*, we used the *R. etli* DEM233 strain with the *nifHc-lacZ* gene fusion (Valderrama et al. 1996), which was engineered with the plasmid pMR4, and then we determined the β -galactosidase activity. *R. etli* DEM233 (control) and DEM233/pMR4 strains were grown under low oxygen concentrations. Figure 4 shows that *R. etli* DEM233 has high β -galactosidase activity in cultures grown between 0.25 and 1% oxygen, and that maximal β -galactosidase activity was detected at 1% oxygen concentration for *R. etli* DEM233 and DEM233/pMR4, but activities de-

clined 80% when the oxygen concentration was increased to 5%. Nevertheless, statistical analysis showed that the β -galactosidase activity was significantly higher (30%) in *R. etli* DEM233/pMR4 than in *R. etli* DEM233 when the strains were grown at 0.25, 0.5, and 0.75% oxygen (Fig. 4). The Vhb transcript was detected in every one of the oxygen concentrations used for this experiment (data not shown).

Symbiotic properties of *R. etli* CE3/pMR4.

Bean plants were inoculated with either *R. etli* CE3/pMR4, carrying the *vhb* gene, or with the *R. etli* CE3 control strain. The total bacterial population isolated from nodules elicited

Table 1. Chemical energy (Chem. en.) content of *Rhizobium etli* CE3 and CE3/pMR4 grown in microaerobic liquid cultures

Oxygen concentration	Strain	ATP	ADP	NADH	NADPH	Chem. en. ^a
		nmol per mg of protein				
0.25%	CE3	0.312	1.023	1.337	0.371	6.44
	CE3/pMR4	0.624	1.653	1.542	0.474	7.97
0.5%	CE3	0.132	0.577	2.001	0.491	8.37
	CE3/pMR4	0.430	1.624	3.573	0.830	15.28
1%	CE3	0.143	0.620	1.252	0.320	5.49
	CE3/pMR4	0.169	0.926	2.104	0.581	9.27

^a Chemical energy expressed as sum of ATP equivalents (1, 1/2, 3, and 4 for ATP, ADP, NADH, and NADPH, respectively) per mg of protein.

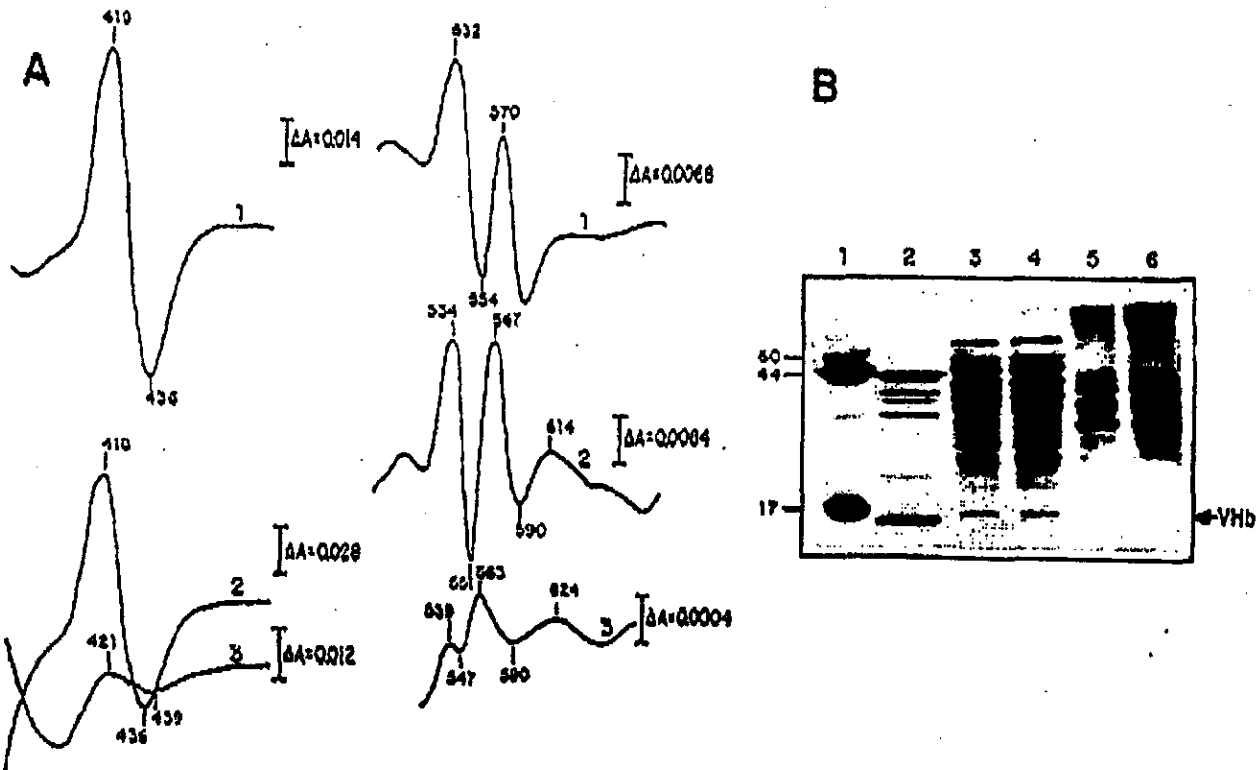


Fig. 2. Spectral and electrophoretic analyses of extracts obtained from *Rhizobium etli* CE3/pMR4 and *R. etli* CE3. A, CO-differential spectra (CO-reduced vs reduced) of partially purified *Vitroscilla* sp. hemoglobin (Vhb; trace 1), *R. etli* CE3/pMR4 (trace 2), and *R. etli* CE3 (trace 3). B, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of protein extracts obtained from *R. etli* CE3/pMR4 and CE3: lane 1, molecular mass markers (in kDa); lane 2, Vhb partially purified from *Escherichia coli*; lanes 3 and 4 (20 and 30 μ g of total protein, respectively), fractionated (45 to 65% saturation with ammonium sulfate) soluble protein obtained from *R. etli* CE3/pMR4; lanes 5 and 6, same as lanes 3 and 4, but obtained from *R. etli* CE3.

by *R. etli* CE3/pMR4 was Tc^r , thus indicating that the plasmid pMR4 was retained in bacteroids during symbiosis. Nodules elicited by *R. etli* CE3/pMR4 showed a more intense red color than those elicited by the wild-type strain CE3. Slot-blot hybridization at high stringency of the *vhb* gene probe with RNA isolated from *R. etli* CE3/pMR4 and CE3 showed that a hybridization signal was detected in *R. etli* CE3/pMR4 but not in

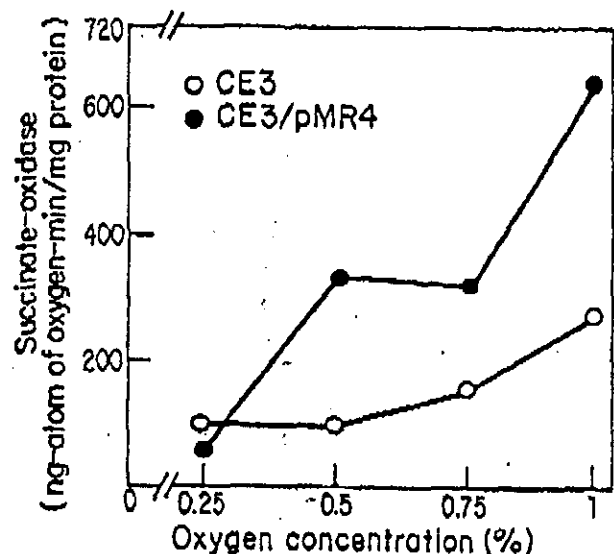


Fig. 3. Respiratory activity of *Rhizobium etli* CE3/pMR4 and CE3 in microaerobic liquid cultures. Oxidase activity present in the CE3 wild-type strain or the CE3/pMR4 strain was measured after 8 h of incubation in microaerobic liquid cultures under different oxygen concentrations.

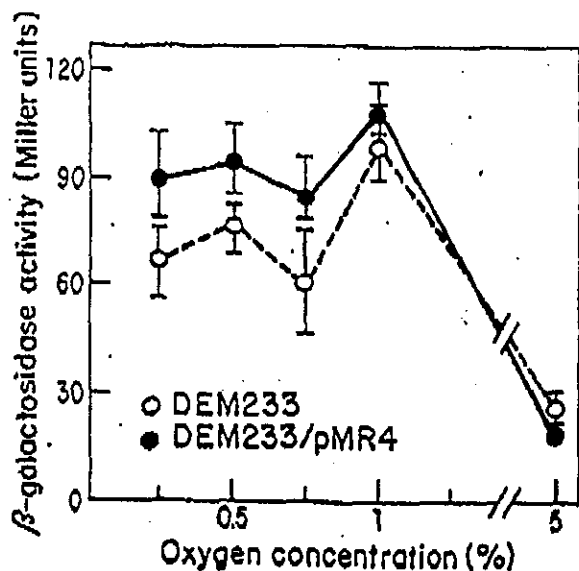


Fig. 4. Induction of the *nifHc* gene from *Rhizobium etli* strains in microaerobic liquid cultures. The β -galactosidase activity present in an *R. etli* DEM233 wild-type strain containing a *nifHc-lacZ* gene fusion and in the same strain but bearing the pMR4 plasmid (*R. etli* DEM233/pMR4) was measured after 8 h of growing in microaerobic liquid cultures under different oxygen concentrations. Values are mean \pm standard deviations of Miller units from four different cultures assayed in duplicate.

CE3, thus indicating that the *vhb* gene was expressed in *R. etli* CE3/pMR4 bacteroids (Fig. 1).

Nodulation, nitrogenase activity, and nitrogen content were determined in bean plants inoculated with *R. etli* CE3 or CE3/pMR4 strains. Nodules elicited by the CE3/pMR4 strain emerged at the same time as those elicited by the wild-type strain, and the nodule dry weight was similar among plants inoculated with the engineered and wild-type strains. Figure 5A shows the results of time-course determinations of nitrogenase-specific activity. At early stages of the symbiosis, 15 and 20 days post inoculation (dpi), when nitrogenase-specific activity peaks, nodules elicited by *R. etli* CE3/pMR4 exhibited nitrogenase activity 68% higher than the values exhibited in nodules formed by the wild-type strain. At 25 dpi and later stages, the nitrogenase activity declined in both strains, although the activity in nodules formed by CE3/pMR4 was slightly higher.

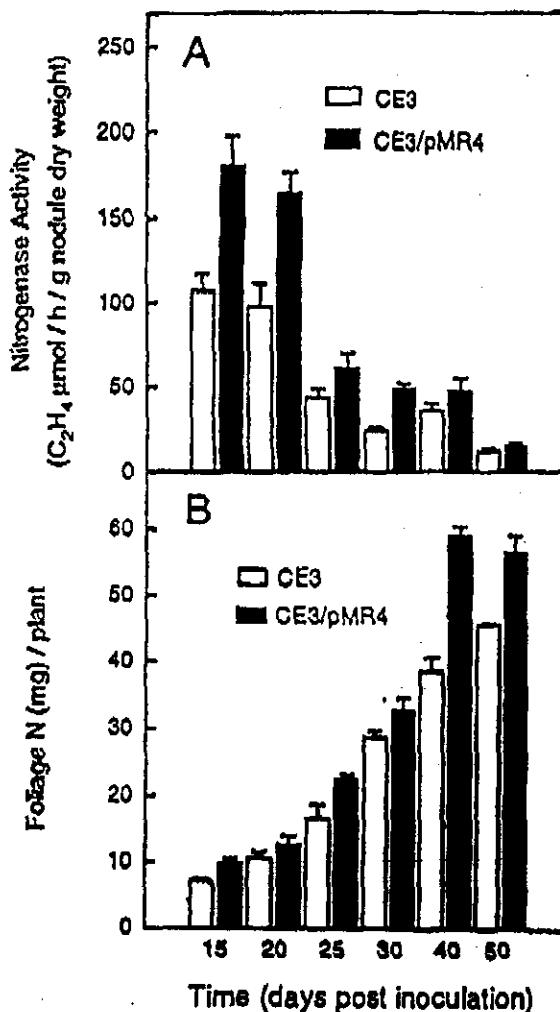


Fig. 5. A, Nitrogenase specific activity and (B) foliage total nitrogen content of *Phaseolus vulgaris* plants inoculated with *Rhizobium etli* CE3 or CE3/pMR4 strains. Values are mean \pm standard deviation of eight plants for each condition. Results shown are for one representative experiment out of five performed.

Isolation of RNA and slot-blot analysis.

RNA from *R. etli* CE3 or CE3/pMR4 free-living cells or bacteroids was isolated with TRIzol Reagent (GIBCO BRL Life Technologies, Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions. Bacteroids were isolated from 18-day-old nodules by centrifuging nodule extracts on a sucrose gradient as previously reported (Soberón et al. 1989). For RNA slot-blot hybridization, isolated RNA was blotted to a Hybond-N⁺ membrane (Amersham International, Buckinghamshire, UK) with the Minifold II Slot Blot system (Schleicher and Schuell, Keene, NH). Membranes were subsequently hybridized with the randomly primed, ³²P-labeled probe *vhb*, and the 16S-rRNA gene obtained from the pKK353 vector (Brosius et al. 1981). Membranes were hybridized at high stringency at 65°C, washed three-times with 0.1x SSC (1x SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) / 0.1% SDS at 60°C, and then the blot was autoradiographed by standard procedures (Sambrook et al. 1989).

Spectral detection of Vhb in recombinant *R. etli* CE3/pMR4.

Engineered and non-engineered *R. etli* strains (CE3/pMR4 and CE3, respectively) were grown in 14 liters of PY broth at 30°C for 20 h, and 25 to 35 g of cell paste was obtained after centrifugation, which was resuspended in 100 ml of 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.4) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Cells were disrupted by sonication at maximum power (five cycles of 1 min each in ice), the resulting solution was cleared by centrifugation at 22,100 × g for 40 min at 4°C, and the supernatant was fractionated with liquid ammonium sulfate between 45 and 65% saturation. The resulting pellet was resuspended in 20 mM Tris-HCl (pH 8) and dialyzed for 18 h against the same buffer to remove the excess of salts. The dialyzed solution was used for spectral and electrophoretic analysis with the Vhb isolated from *E. coli* (below) as a positive control. The amount of protein used for the spectral analysis was 46.5 and 44.2 g for extracts from CE3/pMR4 and CE3 strains, respectively.

Aliquots of the dialyzed solution and the partially purified Vhb isolated from *E. coli* were subjected to spectral analysis. Samples were reduced by adding a few crystals of dithionite (Fluka, Buchs, Switzerland), and the differential CO-reduced versus reduced spectra were obtained in a spectrophotometer (model DU650; Beckman, Palo Alto, CA). Also, electrophoretic analysis of aliquots from the engineered and wild-type rhizobia, and the partially purified Vhb isolated from *E. coli*, was performed by SDS-PAGE (Laemmli 1970). Total protein

was determined by a dye-binding assay (Bio-Rad, Hercules, CA) with bovine serum albumin as standard.

As a positive control, the Vhb synthesized in recombinant *E. coli* was partially purified. Briefly, recombinant *E. coli* cells were grown in LB medium, disrupted, and cleared by centrifugation, and the supernatant was fractionated with ammonium sulfate as above. The red pellet was resuspended in 20 mM Tris-HCl (pH 8), dialyzed for 18 h against the same buffer, and then chromatographed through a DE52-cellulose (Whatman, Hillsboro, OR) resin. Upon protein adsorption to the resin, the Vhb was eluted with a 0 to 100 mM NaCl gradient in the above buffer. Fractions containing the Vhb were pooled and concentrated by ultrafiltration with Amicon (Beverly, MA) concentrators. Preparations containing the Vhb were checked by SDS-PAGE and by spectrophotometry in the visible region (350 to 700 nm).

Respiratory activities.

Oxidase activity was assayed in samples of *R. etli* CE3 or CE3/pMR4 grown microaerobically for 8 h at 30°C. The reaction vessels contained 3 ml of 50 mM potassium phosphate (pH 7.5) and cells (0.4 mg of protein), and oxygen consumption was measured with an oxygen meter (model 52; Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH). For succinate oxidase activity, 40 mM Na-succinate was preincubated for 5 min with cells before oxygen consumption was measured.

Determination of nucleotides.

Nucleotide separation was performed by ion-exchange chromatography (Radial-Pak Sax Cartridge 8 mm × 10 cm; Waters, Milford, MA) from processed samples of *R. etli* microaerobic liquid cultures after 6 h of incubation, as described previously (Cevallos et al. 1996).

Estimation of β-galactosidase activity.

β-Galactosidase activity was determined in 1.5-ml samples of *R. etli* DEM233 or DEM233/pMR4 grown in microaerobic liquid cultures. Samples were incubated for 8 h, and an increase in A₄₂₀ in the presence of *o*-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG) was determined (Valderrama et al. 1996). Activity was expressed as Miller units.

Nitrogenase activity and nitrogen content in bean plants.

Phaseolus vulgaris cv. Negro Jamapa seeds were surface sterilized and germinated as reported (Mendoza et al. 1995). *R. etli* CE3 or CE3/pMR4 strains used as inoculum were grown overnight in PY liquid medium, washed twice with

Table 2. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Rhizobium etli</i>		
CE3	Smr derivative of wild-type CFN42; Nal ^r	Noel et al. 1984
DEM233	<i>nifH</i> - <i>lacZ</i> derivative of CE3	Valderrama et al. 1996
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	Host strain for plasmids	Boyer and Roulland-Dussoix 1969
Plasmids		
pRK2013	Helper plasmid; Km ^r	Figurski and Hellinski 1979
pUC8:15	pUC8 with a 2.2-kb <i>Hind</i> III fragment containing the <i>Vitreoscilla</i> sp. <i>vhb</i> gene plus the native promoter; Ap ^r	Dikshit and Webster 1988
pTR101	pTR100 mini-RK2 vector with the 0.8-kb stability locus; Tc ^r	Weinstein et al. 1992
pMR4	pTR101 with the <i>vhb</i> gene (2.2-kb <i>Hind</i> III fragment) cloned in the <i>Hind</i> III site; Tc ^r	This work

10 mM MgSO₄ and diluted to an A₃₄₀ = 0.05. Germinated seedlings were planted in autoclaved plastic pots (5 seedlings per pot) containing vermiculite as support, and then inoculated with 1 ml of the bacterial suspension per plant (approximately 10⁷ cells per plant). Groups of eight plants inoculated with each *R. etli* strain were harvested at 15, 20, 25, 30, 40, and 50 dpi, and the nodule dry weight, nitrogenase activity, and foliage nitrogen content were determined from each plant. Experiments with the same number of samples per treatment were done five times and similar results were obtained. Nitrogenase activity was determined in detached, nodulated roots by the acetylene reduction method, and were expressed as mol of ethylene per h per g of nodule (dry weight). Total nitrogen content of dried plants was determined with a nitrogen analyzer (ANTEK 7000; Antek Instruments, Houston, TX) and was reported as mg of nitrogen per plant (Cevallos et al. 1996). Times of plant flowering and pod filling were recorded for each experiment. A group of 25 plants inoculated with each strain was grown until seeds were harvested (approximately 65 dpi). Total nitrogen content was determined in powdered seeds (Cevallos et al. 1996) and was expressed as mg of nitrogen per mg of seed (dry weight).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Yolanda Mora, Sandra Contreras, and Claudia Morera for technical assistance. We would like to extend our gratitude to Dale A. Webster, Illinois Institute of Technology, for providing the plasmid pUC8:15. We thank Fernando Valle (IBT, UNAM), Don Helinski (UCSD), and Juan Miranda (IBT, UNAM) for providing other plasmids used. M. R. was supported by a fellowship from DGAPA-UNAM and a grant from PADEP-UNAM. For R. A.-P., partial funding was from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project no. 25229-N).

LITERATURE CITED

- Appleby, C. A. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:443-478.
- Bailey, J. E. 1995. Chemical engineering of cellular processes. *Chem. Eng. Sci.* 50:4091-4108.
- Batut, J., and Boistard, P. 1994. Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:129-150.
- Boyer, H. W., and Roulland-Dussoix, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., and Noller, H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148:107-127.
- Cevallos, M. A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y., and Mora, J. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-β-hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178:1646-1654.
- Chen, W., Hughes, D. E., and Bailey, J. E. 1994. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 10:308-313.
- Davis, T. L., Helinski, D. R., and Roberts, R. C. 1992. Transcription and autoregulation of the stabilizing functions of broad-host-range plasmid RK2 in *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 6:1981-1994.
- DeModena, J. A., Gutierrez, S., Velasco, J., Fernández, F. J., Fachini, R. A., Galazzo, J. L., Hughes, D. E., and Martín, J. F. 1993. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* 11:926-929.
- Dikshit, K. L., Dikshit, R. P., and Webster, D. A. 1990. Study of *Vitreoscilla globin* (vgb) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion. *Nucleic Acids Res.* 18:4149-4153.
- Dikshit, K. L., and Webster, D. A. 1988. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene* 70:377-386.
- Figurki, D. H., and Helinski, D. R. 1979. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1648-1652.
- Fischer, H. M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58:352-386.
- Gilles-Gonzalez, M. A., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. 1991. A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350:170-172.
- Hardison, R. 1998. Hemoglobins from bacteria to man: Evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.* 201:1099-1117.
- Holmberg, N., Lilius, G., Bailey, J. E., and Bulow, L. 1997. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolic production. *Nature Biotechnol.* 15:244-247.
- Kallio, P. T., Kim, D. J., Tsai, P. S., and Bailey, J. E. 1994. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur. J. Biochem.* 219:201-208.
- Khosla, C., and Bailey, J. E. 1988. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature* 331:633-635.
- Khosla, C., Curtis, J. E., DeModena, J., Rinas, U., and Bailey, J. E. 1990. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 8:849-853.
- Khosravi, M., Webster, D. A., and Stark, B. C. 1990. Presence of the bacterial hemoglobin gene improves α-amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Plasmid* 24:190-194.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Layzell, D. B., and Hunt, S. 1990. Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Plant.* 80:322-327.
- Magnolo, S. K., Leenutaphong, D. L., DeModena, J. A., Curtis, J. E., Bailey, J. E., Galazzo, J. L., and Hughes, D. E. 1991. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology* 9:473-476.
- Mendoza, A., Leija, A., Martínez-Romero, E., Hernández, G., and Mora, J. 1995. The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:584-592.
- Noel, K. D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., and Cevallos, M. A. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn3 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
- O'Brian, M. R., and Maier, R. J. 1989. Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium-legume* symbioses. *Biochim. Biophys. Acta* 974:229-246.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Leemans, J., Cevallos, M. A., Pardo, M. A., Azpíroz, R., Girard, M. de L., Calva, E., and Palacios, R. 1985. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1170-1174.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. A. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Soberón, M., Williams, H. D., Poole, R. K., and Escamilla, E. 1989. Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171:465-472.
- Soupee, B., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G., and Bana, 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.
- Spiro, S., and Guest, J. R. 1991. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 16:310-314.
- Tyree, B., and Webster, D. A. 1978. The binding of cyanide and carbon monoxide to cytochrome *c* purified from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.* 253:6988-6991.
- Valderrama, B., Dávalos, A., Girard, L., Morett, E., and Mora, J. 1996. Regulatory proteins and cis-acting elements involved in the transcriptional control of *Rhizobium etli* reiterated *nifH* genes. *J. Bacteriol.* 178:3119-3126.
- Wakabayashi, S., Matsubara, H., and Webster, D. A. 1986. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*

- Webster, D. A. 1987. Structure and function of bacterial hemoglobin and related proteins. Pages 245-265 in: *Advances in Inorganic Chemistry*. O. C. Eichhorn and L. G. Maczilll, eds. Elsevier, New York.
- Webster, D. A., and Liu, C. Y. 1974. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide cytochrome *c* reductase associated with cytochrome *c* purified from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.* 249:4257-4260.
- Wei, M. L. Webster, D. A., and Stark, B. C. 1998. Genetic engineering of *Serratia marcescens* with bacterial hemoglobin gene: Effects on growth, oxygen utilization and cell size. *Biotechnol. Bioeng.* 57:477-483.
- Weinstein, M., Roberts, R. C., and Helinski, D. R. 1992. A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in plant inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. *J. Bacteriol.* 174:7486-7489.
- Wittenberg, J. B., Bergensen, F. J., Appleby, C. A., and Turner, G. L. 1974. Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. *J. Biol. Chem.* 249:4057-4066.
- Wood, P. M. 1984. Bacterial proteins with CO-binding b- or c-type haem. Functions and absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 768:293-317.

IV. DISCUSION

La concentración de O_2 en las células infectadas del nódulo es de 10 a 30 nM, lo cual es aproximadamente 4 órdenes de magnitud menor que la concentración atmosférica de O_2 . Bajo estas condiciones, la concentración de O_2 es un factor que regula la expresión de algunos genes que participan en la fijación simbiótica de nitrógeno. Wittenberg (1974) encontró que la adición de Lb oxigenada a una suspensión de bacteroides daba como resultado un aumento de 10 veces en la actividad de la nitrogenasa, lo cual sugiere que la tasa de fijación de N_2 está limitada por la concentración de O_2 disponible. En esta tesis se reporta el efecto de la expresión del gen de hemoglobina de *Vitreoscilla*, *vhb*, en *Rhizobium etli* tanto en vida libre como en simbiosis. VHb es una hemoglobina que une O_2 de manera reversible y lo libera con facilidad debido a la alta constante de disociación que presenta.

En trabajos relacionados, el gen *vhb* se clonó y expresó de manera estable en huéspedes bacterianos heterólogos (Khoshla y Bailey, 1989; Joshi y Dikshit, 1994). La expresión estable del gen *vhb* en *Rhizobium* se llevó a cabo al utilizar el plásmido pTR101 (Weinstein *et al.*, 1992). Este plásmido es un vector RK2 mini, que confiere resistencia a tetraciclina (Tc^+) y que contiene el operón *par* que confiere estabilidad en las bacterias huésped, aún cuando el crecimiento sea en ausencia de un agente de selección (Roberts *et al.*, 1990). El gen completo para la síntesis de VHb, bajo la acción del promotor nativo, se clonó en el vector pTR101 para dar lugar al plásmido pMR4. Cuando *R. etli* que se había transformado con el plásmido pMR4 se creció en cultivos líquidos por más de 16 generaciones sin selección no se

observó la pérdida del pMR4, lo que indica que este vector es estable en *R. etli* CE3. Por otra parte, los bacteroides que se aislaron a partir de los nódulos de las plantas que se inocularon con *R. etli*CE3/pMR4 formaron colonias resistentes a Tc, indicando que el plásmido pMR4 es estable en los bacteroides durante el proceso simbiótico. La estabilidad del plásmido pMR4 en *R. etli* es importante ya que otros vectores de transformación en *Rhizobium*, que se utilizan para introducir información genética nueva o complementar mutantes afectadas en su capacidad simbiótica, se pierden durante el establecimiento de la simbiosis (Ditta *et al.*, 1980).

El análisis de la expresión del gen *vhb* en *R. etli* CE3/pMR4 en cultivos de vida libre se llevó a cabo mediante hibridación del tipo "slot blot", que permite detectar DNA o RNA en muestras no digeridas de ácidos nucleicos. Al utilizar *vhb* como sonda para RNA total, esta prueba fue específica debido a que la hibridación se llevó a cabo en condiciones de alta astringencia, a 65°C. Las muestras de RNA para la hibridación se obtuvieron a partir de células que crecieron en cultivos de vida libre en condiciones de microaerobiosis, con 0.5% de O₂. La detección por hibridación mostró la presencia del transcrito de *vhb* en *R. etli* CE3/pMR4, mientras que no se detectaron señales inespecíficas en el RNA de *R. etli* CE3, el cual se utilizó como control negativo (Fig. 1 del artículo). Se pudo detectar una señal de la presencia de VHb en *R. etli* CE3/pMR4 en todas las condiciones de concentración de O₂ probadas e incluso en las condiciones de 5% (datos no mostrados).

En análisis similares, al utilizar como molde el RNA de bacteroides de los nódulos inducidos por la cepa *R. etli* CE3/pMR4 y la cepa silvestre *R. etli* CE3, se observó que el gen *vhb* se expresa en los bacteroides de la cepa

transformada (Fig. 1 del artículo). Estos datos indican que el gen *vhb* es activo y que se expresa en *R. etli* CE3/pMR4 en vida libre y en simbiosis. Sin embargo, la expresión de *vhb* no implica que los transcritos se traduzcan en proteína. Por lo tanto, fue necesario detectar VHb en *R. etli* CE3/pMR4. Para este fin, se obtuvieron extractos protéicos a partir de *R. etli* CE3 (control negativo) y CE3/pMR4 que se crecieron en el medio PY durante 20 horas. Cuando las células se crecieron durante 24, 30 ó 48 horas, se obtuvo VHb en la forma oxidada, la cual no es funcional, o en un aparente proceso de degradación. Al mismo tiempo, se purificó VHb a partir de *E.coli* HB101 mediante cromatografía de interacción hidrofóbica e intercambio iónico, la cual se utilizó como control positivo.

La existencia de VHb en organismos heterólogos se ha determinado por medio de espectros diferenciales de monóxido de carbono (CO) (Dikshit *et al.*, 1990; Joshi y Dikshit, 1994). En estos espectros las muestras se reducen con ditionita ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) y posteriormente se burbujea CO, el que se une al Fe de las hemoproteínas para dar lugar a la forma Fe^{2+}CO . Las señales características del espectro diferencial con CO de VHb, tienen máximos de absorción a 419, 532 y 570 nm, y mínimos a 436 y 554 nm (Webster y Liu, 1974; Tyree y Webster, 1978). Para determinar la presencia de VHb en *R. etli* CE3/pMR4 se obtuvieron los espectros diferenciales con CO de los extractos protéicos que se habían fraccionado con sulfato de amonio. Los extractos de *R. etli* CE3 se utilizaron como control negativo. Los resultados mostraron que existen diferencias entre los espectros diferenciales de *R. etli* CE3/pMR4 y CE3 (Fig. 2A del artículo). El espectro de *R. etli* CE3/pMR4 mostró picos y valles similares a los que se obtuvieron en VHb que se había purificado a partir de *E. coli* (Fig. 2A del artículo), y a los que se reportan para VHb de

Vitreoscilla sp. (Webster y Liu, 1974; Tyree y Webster, 1978). Sin embargo en *R.etli* CE3 los picos y valles fueron distintos, aunque se obtuvo un máximo en la región Soret a 421 nm con un valle a 439 nm, la cual es similar a los valores de diversas Hbs en la forma $Fe^{2+}CO$ (Wood, 1984), lo cual sugiere la existencia en *R.etli* CE3 de una hemoproteína con características espectrales similares a las Hbs. El análisis espectral de extractos de *R.etli* CE3/pMR4 mostró que en estas células se sintetiza VHb.

A la fecha no se ha demostrado la existencia de Hbs en rhizobia. Sin embargo, Appleby (1969) reportó análisis espectrales que sugieren la existencia de Hbs en rhizobia. De igual forma, Keister y Marsh (1990), reportaron una hemoproteína reactiva con CO que está presente en la fracción soluble de varias cepas de *Bradyrhizobium*. El espectro diferencial de CO de esta proteína tiene un máximo de absorción a 422 nm, el cual es característico de las Hbs. La existencia de un máximo de absorción a 421 nm en los espectros diferenciales de *R.etli* CE3 sugiere la presencia de una hemoproteína similar a las Hbs. Recientemente, se demostró la existencia de Hbs en diferentes grupos de microorganismos, incluyendo a *E. coli* (Vasudevan *et al.*, 1991); *Alcaligenes eutrophus* (Cramm *et al.*, 1994); *Erwinia chrysantemi* (Favey *et al.*, 1995) y *Vitreoscilla* (Wakabayashi *et al.*, 1986). Por lo tanto, es probable que las Hbs también existan en la familia Rhizobiaceae.

Con el objeto de determinar si VHb sintetizada en *R.etli* CE3/pMR4 es similar a VHb sintetizada por *E. coli*, se analizaron electroforéticamente los extractos de *R.etli* CE3/pMR4 y *R.etli* CE3, al utilizar VHb purificada de *E. coli* como referencia. Los resultados que se obtuvieron mostraron que VHb se sintetiza en *R.etli* CE3/pMR4, y que VHb recombinante comigró con VHb que se obtuvo de *E. coli* (Fig. 2B del artículo). Con base en estos resultados

concluimos que el gen *vhb* se expresa en *R.etli* CE3/pMR4 en cultivos de vida libre bajo condiciones de microaerobiosis (Fig.1 del artículo), y que en las células recombinantes se sintetiza VHb (Fig. 2 del artículo). Por lo tanto, la siguiente pregunta importante fue determinar el efecto fisiológico de la expresión de *vhb* en las bacterias que crecen en vida libre o en simbiosis.

Como ya se mencionó, se ha expresado *vhb* en varios huéspedes heterólogos, tal como *E. coli* (Khosla y Bailey, 1988; Dikshit *et al.* 1992; Tsai *et al.* 1996a y b), *Saccharomyces cerevisiae* (Chen *et al.* 1994); *Streptomyces cividans* (Magnolo *et al.* 1991), *Nicotiana tabaccum* (Holmberg *et al.* 1997) y *Acremonium chrysogenum* (DeModena *et al.* 1993). Los organismos transformados presentaron diferentes efectos debido a la presencia de VHb, tales como (i) aumento en la tasa de crecimiento, (ii) aumento en la densidad celular, (iii) aumento en la síntesis global de proteína, (iv) incremento en la producción de metabolitos específicos, y (v) cambios en las rutas metabólicas y/o generación de energía. Tanto el análisis estequiométrico (Khosla *et al.*,1990), como la determinación experimental de varios parámetros energéticos (Kallio *et al.*,1994), indican que la expresión de VHb en *E. coli* mejora la velocidad de la respiración bajo condiciones microaeróbicas al incrementar la concentración efectiva de O₂ disuelto, y ésto podría causar un incremento en la magnitud del gradiente protón-motriz generado, resultando en una mayor producción de ATP (Kallio *et al.*,1994). Por lo tanto, con base en el efecto de la expresión de VHb en diferentes huéspedes, se consideró importante evaluar la actividad respiratoria, el contenido energético (ATP, ADP, NADH y NADPH), así como el efecto en la expresión en vida libre de los genes *nifH* en *R. etli* C3/pMR4, en comparación con *R.etli* CE3.

La actividad respiratoria de *R.etli* CE3/pMR4 fue de 2 a 3 veces mayor

con respecto a *R. etli* CE3 al crecer en condiciones de microaerobiosis (Fig. 3 del artículo). Estos resultados sugieren que la síntesis de VHb en *R. etli* CE3/pMR4 afecta la actividad de las oxidasas terminales, lo que se refleja en la alta tasa respiratoria de *R. etli* CE3/pMR4. El efecto de la presencia de VHb en organismos heterólogos que crecen en condiciones limitadas de O₂ es el aumento en la actividad respiratoria, y como consecuencia el aumento en la producción de ATP. El mecanismo por el cual se produce este efecto se desconoce, sin embargo, se han realizado experimentos con la finalidad de definir la función de VHb en los organismos transformados. Los resultados que se han obtenido sugieren que la presencia de VHb aumenta la concentración intracelular de O₂ en los organismos que expresan esta proteína. Tsai *et al.* (1996b) reportaron que la expresión intracelular de VHb en *E. coli* aumenta la concentración y actividad del citocromo *bo* con respecto al citocromo *bd*. Estos autores encontraron que la expresión máxima del citocromo *bo* se presenta en condiciones de crecimiento aeróbico, y que su síntesis se reprime en bajas concentraciones de O₂; bajo estas condiciones estos autores también reportan que se induce la producción del citocromo *bd*, el cual tiene una afinidad mayor por el O₂. De acuerdo con estos resultados, Tsai y colaboradores propusieron que al aumentar la concentración intracelular de O₂ debido a la presencia de VHb, se mantiene y aumenta la expresión de las oxidasas terminales aeróbicas, aún cuando en el ambiente existan condiciones limitantes de O₂.

En condiciones de vida libre, *R. etli* expresa al menos 3 oxidasas terminales que consisten en los citocromos *aa₃*, *bo* y *bd* (Barquera *et al.*, 1991; Soberón *et al.*, 1989). Durante el proceso simbiótico se expresan los citocromos *cbb₃*, *aa₃*, y *bo* (Miranda *et al.*, 1996) y la expresión del

citocromo *bd* se reprime (Barquera *et al.*,1991). De acuerdo con lo propuesto por Tsai y colaboradores es factible proponer que la existencia de VHb en *Rhizobium* modifica la concentración intracelular de O₂ lo que induce un aumento en la expresión de los citocromos *aa₃* y *bo* dando como resultado una mayor actividad respiratoria.

Por otra parte, Bailey (1995) propuso que cuando VHb se encuentra presente, la concentración de O₂ en la célula es igual a la suma de la concentración de O₂ disuelto más la concentración de VHb oxigenada. Por lo tanto, VHb oxigenada podría actuar como una fuente adicional de O₂ para las oxidasas terminales. Más aún, VHb presenta una constante de disociación elevada, lo que permite suponer que VHb libera rápidamente el O₂ quedando en disponibilidad de las oxidasas terminales. En el caso de *Rhizobium*, las oxidasas terminales microaróbicas o simbióticas tienen una afinidad alta por el O₂, por lo que la presencia de VHb y la facilidad con que ésta libera el O₂ sería aprovechada para mantener un metabolismo aerobio, lo que resultaría en una mayor eficiencia en la actividad respiratoria y un incremento de la síntesis de ATP (Fig. 8).

El aumento en la actividad respiratoria de *R.etli* CE3/pMR4 debería reflejarse en un aumento en la energía química de esta cepa. Los resultados de este trabajo mostraron que el contenido de nucleótidos fue mayor en *R. etli* CE3/pMR4 con respecto a *R. etli* CE3 (Tabla 1 del artículo). La energía química, expresada como la suma de equivalentes de ATP, fue mayor en la cepa que expresó *vhb* ya que el aumento de la energía química fue de 23, 82 y 69% para las condiciones de 0.25, 0.5 y 1% de O₂, respectivamente (Tabla 1 del artículo). Estos datos reflejan la diferencia en la actividad respiratoria entre *R.etli* CE3/pMR4 con respecto a *R.etli* CE3.

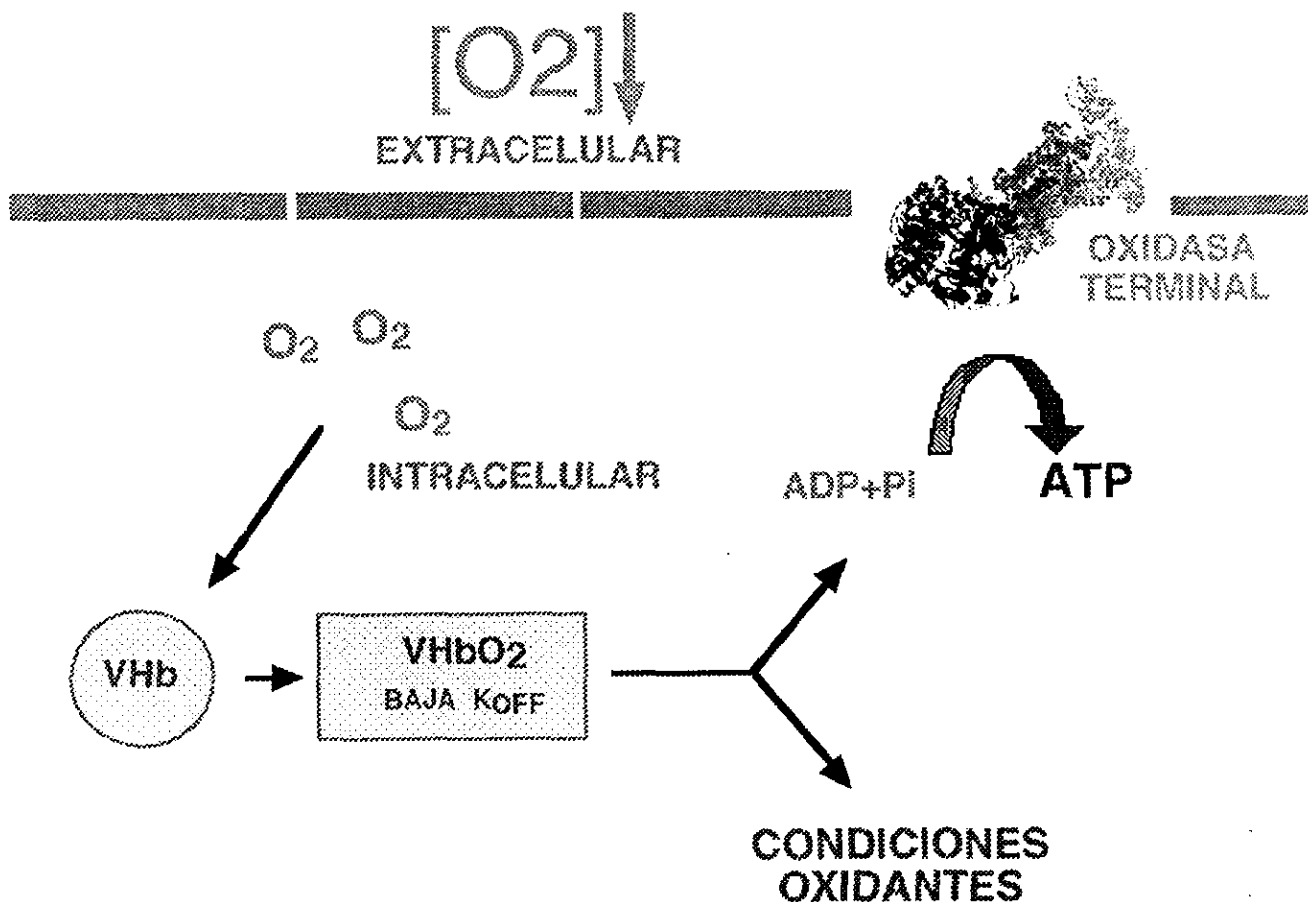


Figura 8. Modelo del posible mecanismo de acción de VHb en el incremento de la actividad respiratoria y síntesis de ATP en las células que sintetizan esta hemoglobina.

El tamaño de las pozas de adenilatos es un indicador común del metabolismo hipóxico en los sistemas biológicos. En las células que crecen en condiciones de O_2 limitante, la concentración de ATP es menor con respecto a las que crecen en condiciones aeróbicas (Pradet y Raymond, 1983). En el caso de *R. etli* CE3/pMR4, la concentración de ATP fue mayor con respecto a *R. etli* CE3 en condiciones limitantes de O_2 . Lo anterior sugiere que la presencia de VHb modificó la concentración intracelular de O_2 en

R. etli CE3/pMR4 al mantener una concentración de O₂ mayor a la que está presente en el medio, lo cual permite una actividad respiratoria mayor, lo que resultó en el aumento de la síntesis de ATP.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron en este trabajo, es evidente que la presencia de VHb en *R. etli* CE3/pMR4 tiene un efecto positivo en la respiración de las bacterias recombinantes. Bajo condiciones limitantes de O₂ *R. etli* CE3/pMR4 presentó un incremento en la actividad respiratoria (Fig 3 del artículo), así como un contenido mayor de energía química (Tabla 1 del artículo), en comparación con *R. etli* CE3.

Para evaluar el efecto de VHb sobre la expresión *ex planta* de *nifHc* se usó la cepa *R. etli* DEM233 (Valderrama *et al.*,1996), la cual presenta una fusión *nifHc-LacZ*. Esta cepa se transformó con el plásmido pMR4 para determinar la actividad de β-galactosidasa en presencia y ausencia de VHb cuando ambas cepas, DEM233 y DEM23/pMR4, se crecieron en las mismas condiciones de microarobiosis que se utilizaron para medir la actividad respiratoria y el contenido de nucleótidos. En ambas cepas, DEM233 y DEM23/pMR4, la expresión máxima de β-galactosidasa se obtuvo a una concentración de O₂ del 1%, y esta actividad disminuyó aproximadamente un 80% cuando la concentración de O₂ aumentó al 5% (Fig. 4 del artículo). Sin embargo, la cepa DEM233/pMR4 presentó una expresión de β-galactosidasa entre 30 y 40% mayor con respecto a la cepa DEM233 cuando se creció en las condiciones de mayor limitación de O₂ (Fig. 4 del artículo). Cuando se usaron bajas concentraciones de O₂, 0.25 a 0.75 %, la presencia de VHb tuvo un efecto positivo en la expresión *ex planta* del gen *nifHc*. Al parecer en condiciones de microaerobiosis la presencia de VHb oxigenada permite que la concentración de O₂ dentro de la bacteria sea cercana al nivel óptimo, lo que

permite la transcripción eficiente de los genes *nifH*, que son los responsables de la síntesis de la nitrogenasa. En este trabajo no se detectó ningún efecto de la presencia de Vhb en la expresión de *nifHc* cuando la concentración de O₂ fue del 5%, en donde no se activa la expresión de *nifHc* y decrece la presencia de Vhb. Sin embargo, el efecto de la presencia de Vhb en los bacteroides podría ser mayor al alterar la inducción de la expresión de los genes *nifH*, ya que la concentración de O₂ en los nódulos es mucho menor con respecto a las condiciones microaróbicas utilizadas en nuestros experimentos.

Se ha propuesto que la expresión de Vhb en microorganismos industrial o agrónomicamente importantes podría dar lugar a beneficios comerciales (Dikshit *et al.*,1990). Aunque se ha demostrado que Vhb ayuda a incrementar la producción de metabolitos secundarios al mantener la concentración de O₂ disuelto en niveles suficientes para promover el crecimiento (Khosla y Bailey, 1988; Khosravi *et al.*,1990; Magnolo *et al.*,1991), la contribución posible de Vhb en los procesos agrícolas, como la fijación de N₂, no se ha estudiado. Por lo tanto, con base en los resultados que se obtuvieron sobre el efecto de Vhb en cultivos de vida libre, se investigó el efecto de la presencia de Vhb en bacteroides de *R. etli* CE3/pMR4 durante el proceso de simbiosis con frijol. Los parámetros que se evaluaron fueron: (i) nodulación (ii) actividad de la nitrogenasa, (iii) contenido total de N₂, (iv) contenido de N₂ en semillas, y (v) desarrollo de las plantas.

Como se mencionó anteriormente, el análisis de hibridación del tipo "slot blot", al utilizar el RNA aislado de bacteroides de nódulos inducidos por *R.etli* CE3/pMR4, mostró que el gene *vhb* se expresa en estos bacteroides (Fig. 1 del artículo). Por otra parte, se realizó un ensayo cualitativo de la

expresión de *nifHc::lacZ* en nódulos inducidos por las cepas *R.etli* DEM233 y DEM233/pMR4, encontrando una mayor actividad de β -glucoronidasa en los nódulos inducidos por la cepa transformada (datos no presentados).

Los datos que se obtuvieron en este trabajo (Fig. 5 del artículo) indican que la expresión de *vhb* en bacteroides de *R.etli* CE3/pMR4 mejora la fijación de N_2 en la simbiosis con el frijol bajo condiciones de invernadero. El efecto positivo de la presencia de Vhb en los bacteroides se refleja principalmente en las etapas tempranas de la simbiosis, 15 a 20 días después de la inoculación, en donde se presentó un incremento significativo en la actividad específica de la nitrogenasa. La cepa transformada, *R.etli* CE3/pMR4, presentó valores mayores, cerca del 68%, con respecto a la cepa silvestre, *R.etli* CE3 (Fig. 5A del artículo). La actividad nitrogenasa se mantuvo ligeramente superior en los nódulos inducidos por *R.etli* CE3/pMR4 hasta las últimas etapas de evaluación, 50 días después de la inoculación.

El resultado del incremento en la actividad nitrogenasa en los nódulos de las plantas inoculadas con *R.etli* CE3/pMR4 debería, tal vez, reflejarse en una acumulación mayor de N_2 . El contenido total de N_2 de las plantas que se inocularon con *R.etli* CE3/pMR4 fue mayor con respecto a las que se inocularon con *R.etli* CE3, en donde las diferencias variaron entre 14 y 53% (Fig. 5B del artículo). Se determinó el peso seco de las plantas en el tiempo de evaluación, y se encontró que el peso seco de las plantas inoculadas con *R.etli* CE3/pMR4 fue ligeramente superior, entre un 10 y 20%, con respecto a las inoculadas con *R.etli* CE3. Más aún, en las condiciones que se utilizaron en este trabajo para el desarrollo de la simbiosis, *R.etli* CE3/pMR4 indujo el inicio temprano de la fijación de N_2 en las plantas de frijol, mejorando el desarrollo de la planta adelantando del proceso de floración y formación de vainas. Imsade (1989) reporta resultados similares al encontrar que en las

plantas de soya con una rápida fijación de N_2 se mejora el desarrollo vegetativo de las plantas y se acorta el período de formación de semillas. En este trabajo las plantas que se inocularon con *R.etli* CE3/pMR4 presentaron un contenido de N_2 , 16% mayor, con respecto a las semillas provenientes de las plantas inoculadas con *R.etli* CE3.

Existen pocos reportes sobre la modificación del genoma de *Rhizobium* para mejorar la fijación simbiótica de nitrógeno, y no siempre existe una correlación entre la actividad nitrogenasa y el contenido total de N_2 de las plantas. Las plantas de frijol inoculadas con cepas mutantes que presentan una mayor actividad respiratoria, debido al aumento de la expresión del citocromo aa_3 y la expresión del citocromo cbb_3 , fijan entre 25 y 33% más N_2 en comparación con las plantas inoculadas con la cepa silvestre. En las plantas inoculadas con la cepa mutada se presentó una alta actividad nitrogenasa en las etapas tempranas de la simbiosis (Soberón *et al.*, 1989; Miranda *et al.*, 1996). Cevallos *et al.* (1996), reportan que cuando las plantas de frijol se inocularon con *R. etli* que contiene una mutación que afecta la síntesis de poli- β -hidroxibutirato el contenido de N_2 en las plantas inoculadas con esta cepa es 55% mayor a los 38 días después de la inoculación, y 25% mayor a los 45 días después de la inoculación, con respecto a la cepa silvestre.

Con base en los resultados que se obtuvieron sobre el efecto de la expresión de *vhb* en *R.etli* CE3/pMR4, tanto en vida libre como en simbiosis, podemos proponer que la expresión de una proteína que transporta el O_2 , como Vhb, en *R. etli* estimula la eficiencia respiratoria de la bacteria lo que resulta en una mayor producción de ATP. Al mismo tiempo, la síntesis de Vhb tuvo efecto en una mayor expresión del gen *nifH*, y permite explicar los altos

niveles de actividad nitrogenasa medida durante la simbiosis, así como el contenido mayor de N_2 que se observaron en las plantas inoculadas con *R. etli* CE3/pMR4 (Fig. 9).

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo sobre el fenotipo simbiótico de *R. etli* CE3/pMR4, que expresa Vhb, es una contribución a la investigación aplicada de la fijación simbiótica de nitrógeno. Para obtener conclusiones definitivas será necesario desarrollar experimentos en el campo donde se consideren aquellos factores ambientales que determinan una relación simbiótica exitosa.

El enfoque que se utilizó en este trabajo genera un sistema para la modulación intracelular del O_2 , lo cual permite la regulación de los genes simbióticos fundamentales. Este sistema permite ser optimistas en la exploración de la regulación por O_2 a nivel de la expresión de genes simbióticos, así como el control de la planta en la actividad del nódulo.

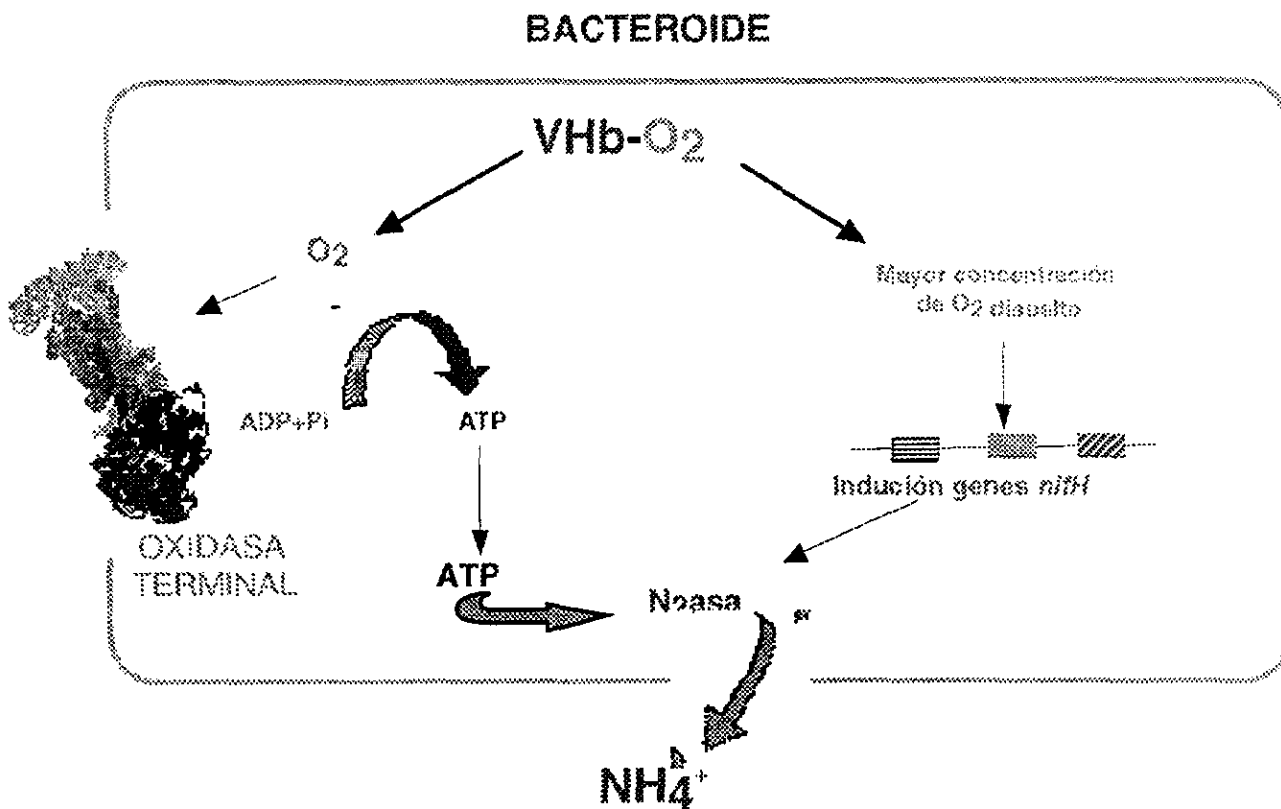


Figura 9. Efecto de la presencia de Vhb en *R. etli*, que propicia un incremento en la fijación simbiótica de nitrógeno con frijol.

REFERENCIAS.

- Aguilar, O.M., Reilyer, H., Arnold, W. y Puhler, A. (1987). *Rhizobium meliloti nifN (fixF)* gene is part of an operon regulated by a *nifA*-dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to the *nifK* gene product. *J Bacteriol.* **169**, 5393-5400.
- Anthamatten, D., Scherb, B. y Hennecke, H. (1992). Characterization of a *fixLJ*-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene showing similarity with the *Escherichia coli fnr* and *Rhizobium meliloti fixK* gene. *J. Gen. Microbiol.* **174**, 2111-2120
- Appleby, C.A. (1969). Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. I. Haemoprotein P-450, other CO-reactive pigments, cytochromes and oxidases in bacteroid from N₂ fixing root nodules. *Biochim. Biophys. Acta.* **172**, 71-87.
- Appleby, C.A. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**, 443-478.
- Appleby, C.A. (1992). The origin and functions of hemoglobins in plants. *Sci. Progress.* **76**, 365-398.
- Arredondo-Peter, R., Hargrove, M.S., Moran, J.F. y Klucas, R.V. (1997). Rice hemoglobins: gene cloning, analysis and oxygen-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* **115**, 1259-1266.
- Atkins, C.A., Hunt, S. y Layzell, D.B. (1993). Gaseous diffusive properties of soybean nodules cultured whit non-ambient pO₂. *Physiol. Plant.* **87**, 89-95.
- Bailey, J..E. (1995). Chemical engineering of cellular processes. *Chem. Eng. Sci.* **50**, 4091-4108.
- Barquera, B., García-Horsman, A. y Escamilla, J.E. (1991). Cytochrome *d* expression pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* **155**, 114-119.

Bashirova, N.F., Inozemtseva, I.A., Melik-Sarkisyan, S. y Kretovich, V.L. (1978). Effect of hemoproteins on nitrogen fixing activity of the bacteroids of *Rhizobium lupini*. *Fiziol. Rust.* 25, 18-24.

Batut, J., Daveran-Mingot, M.L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A.M. y 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.

Batut, J. y Boistard, P. (1994). Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 66, 129-150.

Becana, M. (1995). Hemoglobinas Vegetales. *Investigación y Ciencia.* 221, 16-23

Bergersen, F.J. (1962). The effects of partial pressure oxygen upon respiration and nitrogen fixation by soybean root nodules. *J. Gen. Microbiol.* 29, 113-125.

Bergersen, F.J. (1982). *Root Nodules of Legumes. Structure and Function*, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester:

Bogusz, D., Appleby, C.A., Landsmann, J., Dennis, E.S., Trinick, M.J. y Peacock, W.J. (1988). Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. *Nature* 331, 178-180.

Cevallos, M.A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y. 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.

Chen, W., Hughes, D.E. y Bailey, J.E. (1994). Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 10, 308-313.

Colonna-Romano S, Arnold, W., Schluter, A., Boistard, P., Pühler, A. y Priefer, U.B. (1990). An Fnr-like protein encoded in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* shows structural and functional homology to *Rhizobium meliloti* FixK. *Mol. Gen. Genet.* 223,138-147

- Cramm, R., Siddiqui, R.A. y Friedrich, B. (1994).** Primary sequence and evidence for a physiological function of the flavohemoprotein of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol Chem.* **269**, 7349-7354.
- Cutting, J.A. y Schulman, H.M. (1969).** The site of heme synthesis in soybean root nodules. *Biochem. Biophys. Acta* **192**, 486-493.
- Dakora, F.D. y Atkins, C.A. (1991).** Adaptation of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth in rhizospheres containing nonambient partial pressure of oxygen. *Plant Physiol.* **96**, 728-736.
- David, M., Daveran, M.L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P. y Kahn, D. (1988).** Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**, 671-683.
- de Bruijn, F.J. y Schell, J. (1992).** Regulation of plant genes specifically induced in developing and mature nitrogen fixation nodules: *cis*-acting elements and *trans*-acting factors. In: *Control of Plant Gene Expression*, p. p.241-258. Edited by Verma, D.P.S. Boca Raton, FL: CRS press.
- De Hollander, J.A. y Stouthamer, A.H. (1980).** The electron transport chain of *Rhizobium trifolii*. *Eur. J. Biochem.* **111**, 473-478.
- DeModena, J.A., Gutierrez, S., Velasco, J., Fernández, F. J., Fachini, R.A., Galazzo, J.L., Hughes, D.E. y Martin, J.F. (1993).** The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Biotechnology* **11**, 926-929.
- Dikshit, K.L. y Webster, D.A. (1988).** Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene* **70**, 377-386.
- Dikshit, K.L., Dikshit, R.P. y Webster, D.A. (1990).** Study of *Vitreoscilla* globin (*vgb*) gene expression and promoter activity in *Escherichia coli* through transcriptional fusion. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4149-4155.
- Dikshit, R.P., Dikshit, K.L., Liu, Y.X. y Webster, D.A. (1992).** The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 241-245.

- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D.R. (1980).** Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 7347-7351.
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A. y Kim, C.H. (1987).** The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* **169**, 3217-3223.
- Dreyfus, B.L., Elmerich, C. y Dommergues, Y. (1983).** Free living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as a sole nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 711-713.
- Duff, S.M. G. Wittenberg, J. B. y Hill, R. D. (1997).** Expression, purification, and properties of recombinant barley (*Hordeum* sp.) hemoglobin. optical spectra and reactions with gaseous ligands. *J. Biol. Chem.* **272**, 16746-16752.
- Favey, S., Labesse, G., Vouille, V. y Boccara, M. (1995).** Flavohaemoglobin HmpX: a new pathogenicity determinant in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Microbiology.* **141**, 863-871.
- Franssen, H.J., Vijn, I., Yang, W.C. y Bisseling, T. (1992).** Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant. Mol. Biol.* **19**, 89-107.
- Fisher, H.M. (1994).** Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**, 352-368.
- Fisher, R.F. y Long, S.R. (1992).** *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**, 655-660.
- Gallon, J.R. (1992).** Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. *New Phytol.* **122**, 571-609.
- Gibson, Q.H., Wittenberg, J.B., Wittenberg, B.A., Bogusz, D. y Appleby C.A. (1989).** The kinetics of ligand binding of plant hemoglobins; Structural implications. *J. Biol. Chem.* **264**, 100-107
- Gilles-González, M.A., Ditta, G.S. y Helinski, D.R. (1991).** A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* **350**, 170-172.

- Gilles-González, M.A. y González, G. (1993).** Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *Biol. Chem.* **268**,16293-16297.
- Goethals, K., Van Montagu, M. y Holsters, M. (1992).** Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1646-1650.
- Goldberg, D.E. (1995).** The enigmatic oxygen-avid hemoglobin of *Ascaris*. *BioEssays*. **17**, 171-182.
- Hardison, R.C. (1996).** A brief history of hemoglobins: plants, animal protist and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 5675-5679.
- Hennecke, H. (1993).** The role of respiration in symbiotic nitrogen fixation. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*, p. p.55-64. Edited by Palacios, R., Mora, J. and Newton, W.E. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Hirsch, A.M. (1992).** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**, 211-237.
- Holmberg, N., Lilius, G., Bailey, J.E. y Bulow, L. (1997).** Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nat. Biotechnol.* **15**, 244-247.
- Hunt, S., King, B.J., Canvin, D.T. y Layzell, D.B. (1987).** Steady and non-steady state gas exchange characteristics of soybean nodules in relation to the oxygen diffusion barrier. *Plant Physiol.* **84**, 164-172.
- Hunt, S., King, B.J. y Layzell, D. B. (1989).** Effects of gradual increases in oxygen on nodule activity in soybean. *Plant Physiol.* **91**, 315-321.
- Hunt, S. y Layzell, D. B. (1993).** Gas exchange on legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 483-511.
- Iannetta, P.P.M., De Lorenzo, C., James, E.K., Fernández-Pascual, M., Sprent, J.I., Lucas, M.M., Witty, J.F., De Felipe, M.R. y Minchin, F.R. (1993).** Oxygen diffusion in lupin nodules. I. Visualization of diffusion

barrier operation. *J. Exp. Bot.* **44**, 1461-1467.

Imsande, J. (1989). Rapid dinitrogen fixation during soybean pod fill enhances net photosynthetic output and seed yield: A new perspective. *Agron. J.* **81**, 549-556.

Iuchi, S. y Lin, E.C. (1988). *arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**, 1888-1892.

Iuchi, S. y Lin, E.C. (1993). Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* **9**, 9-15.

Jahn, D., Ver Kamp, E. y Soll, D. (1991). Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 215-218.

Joshi, M. y Dikshit, K.L. (1994). Oxygen dependent regulation of *Vitreoscilla* globin gene: evidence for positive regulation by FNR. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **202**, 535-542.

Kahn, D. y Ditta, G. (1991). Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors. *Mol. Microbiol.* **5**, 987-997.

Kahn, D., Batut, J., Deveran, M.L. y Fourment, J. (1993). Structure and regulation of the *fixNOQP* operon from *Rhizobium meliloti*. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*, p. p.474. Edited by Palacios, R., Mora, J. and Newton, W.E. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Kallio, P.T., Kim, D.J., Tsai, P.S. y Bailey, J.E. (1994). Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur. J. Biochem.* **219**, 201-208.

Kallio, P.T., Tsai, P.S. y Bailey, J.E. (1996). Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin is superior to horse heart myoglobin or yeast flavohemoglobin expression for enhancing *Escherichia coli* growth in a microaerobic bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **12**, 751-757.

Kaminski, P.A., Mandon, K., Arigoni, F., Desnoues, N. y Elmerich, C. (1991). Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1983-1991

Keister, D.L. y Marsh, S.S. (1990). Hemoproteins of *Bradyrhizobium japonicum* cultured cells and bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2736-2741.

Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H. y Kiley, P.J. (1997). Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 6087-6092

Khosla, C. y Bailey, J.E. (1988). Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature.* **331**, 633-635.

Khosla, C. y Bailey, J.E. (1989). Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 5990-6004.

Khosla, C., Curtis, J.E., DeModena, J., Rinas, U. y Bailey, J.E. (1990). Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Bio/technology.* **8**, 849-853.

Khosravi, M., Webster, D.A. y Stark, B.C. (1990). Presence of the bacterial hemoglobin gene improves alpha-amylase production of a recombinant *Escherichia coli* strain. *Plasmid.* **24**, 190-194.

Kitts, C.L. y Ludwig, R.A. (1994). *Azorhizobium caulinodans* respire with at least four terminal oxidases. *J. Bacteriol.* **176**, 886-895.

Kretovich, W.L., Romanov, V.I. y Korolyov, A.U. (1973). *Rhizobium leguminosarum* cytochromes (*Vicia faba*). *Plant Soil.* **39**, 614-634.

Kubo, H. (1939). Über hamoprotein aus den wurzelknöllchen von leguminosen. *Acta Phytochim.* (Tokyo). **11**, 195-200.

Kuzma, M.M., Hunt, S. y Laysell, D.B. (1993). Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in

individual soybean nodules. *Plant Physiol.* 101, 161-169.

Laane, C., Haaker, H. y Veeger, C. (1978). Involvement of the cytoplasmic membrane in nitrogen fixation by *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. *Eur. J. Biochem.* 87, 147-153.

LaCelle, M., Kumano, M., Kurita, K., Yamane, K., Zuber, P. y Nakano, M.M. (1996). Oxygen-controlled regulation of the flavohemoglobin gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 3803-3808.

Landsmann, J., Dennis, E.S., Higgins, T.J.V., Appleby, C.A., Kortt, A.A. y Peacock, W.J. (1986). Common evolutionary origin of legume and non-legume plant haemoglobins. *Nature* 324, 166-168.

Layzell, D.B. y Hunt, S. (1990). Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Plant.* 80, 322-327.

Layzell, D.B., Diaz del Castillo, L., Hunt, S., Kuzma, M., Van Cauwenberghe, O. y Oresnik, I. (1993). The regulation of oxygen and its role in regulating nodule metabolism. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*, p. p.393-398. Edited by Palacios, R., Mora, J. and Newton, W.E. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Lazizzera, B.A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M.C. y Kiley, P.J. (1996). DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* 271, 2762-2768.

Long, S.R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56, 203-214.

Magnolo, S.K., Leenutaphong, D.L., DeModena, J.A., Curtis, J.E., Bailey, J.E., Galazzo, J.L. y Hughes, D.E. (1991). Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* and growth of *Streptomyces lividans* are improved by the expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/technology.* 9, 473-476.

Mandon, K., Kaminsky, P.A. y Elmerich, C. (1994). Functional analysis of *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J. Bacteriol.* 176, 2560-2568.

Preising, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C.A. y Hennecke, H. (1996). A high affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **178**, 1532-1538.

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

Roberts, R.C., Burioni, R. y Helinski, R. (1990). Genetic characterization of the stabilizing functions of a region of broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* **172**, 6204-6216.

Ronson, C.W., Nixon, B.T. y Ausubel, F.M. (1987). Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell* **49**, 579-581.

Sánchez, F., Padilla, J.E., Pérez, H. y Lara, M. (1991). Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 507-528.

Santana, M.A., Pihakaski-Maunsbach, K., Sandal, N., Marcker, K.A. y Smith, A.G. (1998). Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant. Physiol.* **116**, 1259-1269.

Schlüter, A., Patschkowski, T., Uden, G. y Priefer, U.B. (1992). The *Rhizobium leguminosarum* FnrN protein is functionally similar to *Escherichia coli* Fnr and promotes heterologous oxygen-dependent activation of transcription. *Mol. Microbiol.* **6**, 3395-3404.

Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizer, H., Glushka, J.N., Endre, G., Gero, S.D. y Kondorosi, A. (1992). *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 192-196.

Sheeby, J.E. y Bergersen, F.J. (1987). A simulation study of the functional requirements and distribution of leghaemoglobin in relation to biological nitrogen fixation in legume root nodules. *Ann. Bot.* **58**, 121-136.

- Soberón, M., Williams, H.D., Poole, R.K. y Escamilla, E. (1989).** Isolation of a *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **171**, 465-472.
- Soupène, E., Foussard, M., Boistard, P., Truchet, G. y 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.
- Spaink, H.P. y Lugtenberg, B.J. (1994).** Role of rhizobial lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1413-1422.
- Spiro, S. y Guest, J.R. (1991).** Adaptative responses to oxygen limitation in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 310-314.
- Spiro, S. (1994).** The FNR family of transcriptional regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **66**, 23-36.
- Stam, H., van Verseveld, W., de Vries, W. y Stouthamer, A.H. (1984).** Hydrogen oxidation and efficiency of nitrogen fixation in succinate-limited chemostat cultures of *Rhizobium* ORS571. *Arch. Microbiol.* **139**, 53-60.
- Szeto, W.W., Nixon, B.T., Ronson, C.W. y Ausubel, F.M. (1987).** Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.* **169**, 1423-1432.
- Takagi, T. (1993).** Hemoglobins from single-celled organisms. *Curr. Op. Struc. Biol.* **3**, 413-418.
- Tarricone, C., Galizzi, A., Coda, A., Ascenzi, P. y Bolognesi, M. (1997).** Unusual structure of the oxygen-binding site in the dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* sp. *Structure.* **5**, 497-507.
- Trevaskis, B., Watts, R.A., Andersson, C.R., Llewellyn, D.J., Hargrove, M.S., Olson, J.S., Dennis, E.S. y Peacock, W.J. (1997).** Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 12230-12234.

Tsai, P.S., Hatzimanikatis, V. y Bailey, J. E. (1996a). Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin dosage on microaerobic *Escherichia coli* carbon and energy metabolism. *Biotech. Bioeng.* **49**, 139-150.

Tsai, P.S., Nadeli, M. y Bailey, J. E. (1996b). Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin modifies microaerobic *Escherichia coli* metabolism through elevated concentration and specific activity of cytochrome *o*. *Biotech. Bioeng.* **49**, 151-160

Tjepkema, J.D. y Yocum, C.S. (1974). Measurements of O₂ partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrodes. *Planta.* **119**, 351-360.

Tyree, B. y Webster, D.A. (1978). The binding of cyanide and carbon monoxide to cytochrome *o* purified from *Vitreoscilla*. Evidence for subunit interaction in the reduced protein. *J. Biol. Chem.* **253**, 6988-6991.

Uden, G., Bongaerts, J., Becker, S., Holighaus, G., Schirawski, J. y Six, S. (1995). O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **164**, 81-90.

Valderrama, B., Dávalos, A., Girard, L., Morett, E. y Mora, J. (1996). Regulatory proteins and *cis*-acting elements involved in the transcriptional control of *Rhizobium etli* reiterated *nifH* genes. *J. Bacteriol.* **178**, 3119-3126.

Van Kamen, A. (1995). The molecular development on nitrogen fixing root nodules. In: *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, p. p.9-14. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Vance, C.P. (1996). Enhanced agricultural sustainability through biological nitrogen fixation. In: *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. p.p.179-186. Edited by Legocki, A., Bothe, H. y Pühler A. Springer-Verlag Berlin.

Vance, C.P. y Graham, P.H. (1995). Nitrogen fixation in agriculture: applications and perspectives. In: *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, p.p. 77-86. Edited by Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.i. and Newton, W.E. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Vasudevan, S.G., Armarego, W.L., Shaw, D.C., Lilley, P.E., Dixon, N.E. y Poole, R.K. (1991). Isolation and nucleotide sequence of the *hmp* gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 226,49-58.

Wakabayashi, S., Matsubara, H. y Webster, D.A. (1986). Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature.* 322, 481-483.

Webster, D.A. (1988). *Adv. Inorg. Chem.* 7, 245-265.

Webster, D.A. y Liu, C.Y. (1974). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide cytochrome *c* reductase associated with cytochrome *c* purified from *Vitreoscilla*. *J. Biol. Chem.* 249, 4257-4260.

Weinstein, M., Roberts, R.C. y Helinski, R. (1992). A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in plant inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. *J. Bacteriol.* 174, 7485-7489.

Werner, D. (1992). Physiology of nitrogen fixing nodules: compartments and functions. In: *Biological Nitrogen Fixation*, p.p. 391-431 Edited by Stacey, G., Burris, R. and Evans, H. New York: Chapman & Hall.

Wittenberg, J.B. (1974). Facilitated oxygen diffusion: the role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. *J. Biol. Chem.* 249, 4057-4066.

Witty, J.F., Skot, L. y Revsbech, N.P. (1987). Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O₂ diffusion. *J. Exp. Bot.* 38, 1129-1140.

Wood, P. M. (1984). Bacterial proteins with CO-binding *b* or *c* type haem; Functions and absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 769, 293-317.

Woese, C.R., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Hahn, C.M., Tanner, R.S., Krieg, N.R., Koops, H.P., Harms, H. y Stackebrandt, E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: beta subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5, 327-336.

Wycoff, K.L, Hunt, S., Gonzales, M.B, VandenBosch, K.A, Layzell, D.B. y Hirsch, A.M. (1998). Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfalfa. *Plant Physiol.* **117**, 385-395.

Young, P. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: *Biological Nitrogen Fixation*, p.p.43-86. Edited by Stacey, G., Burris, R. and Evans, H. New York: Chapman & Hall.

Zhu, H. y Riggs, A.F. (1992). Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 5015-5019.