

25  
28j

013072

FALLA DE ORIGEN  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICACION DE GENES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESION  
DE CITOCROMOS TIPO c Y LA OXIDASA TERMINAL aa<sub>3</sub> DE  
*Rhizobium etli*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
BIOTECNOLOGIA

PRESENTA LA ALUMNA

MARIA LUISA TABCHE BARRERA

CUERNAVACA, MORELOS 1995



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| I. Introducción.....                                    | 1  |
| II. Antecedentes y objetivo.....                        | 8  |
| III. Resultados.....                                    | 9  |
| 1. Caracterización de la inserción Tn5 .....            | 9  |
| 2. Composición de citocromos.....                       | 10 |
| 3. Clonación del gene responsable del fenotipo TMPD-... | 10 |
| 4. Complementación genética.....                        | 11 |
| 5. Determinación de la secuencia de DNA.....            | 12 |
| 6. Complementación genética de la cepa CFN4202.....     | 13 |
| IV. Discusión y Conclusión.....                         | 15 |
| V. Material y Métodos.....                              | 19 |
| VI. Bibliografía.....                                   | 24 |

## INTRODUCCION

Un número limitado de organismos procariontes son capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico para sintetizar compuestos nitrogenados necesarios para el metabolismo celular. Las tierras cultivadas extensivamente son deficientes en nitrógeno. La disponibilidad de nitrógeno en el suelo (amonio) depende de la adición de fertilizantes por el hombre. Los fertilizantes nitrogenados que se utilizan en la agricultura se sintetizan a partir de nitrógeno atmosférico, por un proceso que requiere de presión y temperaturas altas que se alcanzan a expensas de combustibles derivados del petróleo. Si los requerimientos de las plantas pudieran satisfacerse directamente por la fijación biológica de nitrógeno habría un ahorro de recursos naturales no renovables. Es por ésto que en los últimos años se le ha dado una gran importancia al estudio del proceso de fijación simbiótica de nitrógeno.

En la naturaleza existen dos tipos de organismos que fijan nitrógeno atmosférico: los de vida libre y aquéllos que necesitan establecer una relación simbiótica. Los primeros son capaces de realizar la fijación de nitrógeno sin necesidad de una simbiosis y lo utilizan para su crecimiento, ejemplos de este tipo de organismos son: *Clostridium* y *Azotobacter*. Los organismos que necesitan establecer una relación simbiótica son los que interactúan con plantas leguminosas, como es el caso de *Rhizobium etli* con frijol y *Bradyrhizobium japonicum* con soya.

A continuación se mencionan algunos aspectos importantes que intervienen en la relación simbiótica.

### LA NITROGENASA

La nitrogenasa es la enzima cuya función es catalizar la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$  en organismos fijadores de nitrógeno.

La nitrogenasa mejor caracterizada consiste de dos componentes: una ferro-proteína (Fe) y una ferro-molibdeno proteína (FeMo). Juntas, concilian la dependencia de ATP y la reducción de sustratos. Ambas proteínas catalizan la fijación de nitrógeno; la FeMo-proteína funciona como una nitrógeno reductasa y la Fe-proteína actúa como un donador de electrones para la FeMo-proteína por lo que la Fe-proteína es reducida por una ferredoxina o flavodoxina (Rees *et al*, 1993).

La nitrogenasa que usa un cofactor de vanadio y hierro (VFe) y de (Fe) hierro no está tan ampliamente distribuida como la primera; esta última enzima es también conocida como nitrogenasa alterna (Newton, 1993).

Algunos géneros en los que se encuentra ampliamente distribuida la nitrogenasa que usa el Mo como cofactor son: *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Rhodobacter*, *Anabaena*, *Rhodospirillum* y *Rhizobium* (Newton,1993). *A.vinelandii* y *R.capsulatus* poseen una nitrogenasa que usa Fe como cofactor. Por último los microorganismos que poseen una nitrogenasa con Va como cofactor son: *C. pasteurianum*, *A. varibilis*, *Azomonas agilis*, *Methanosarsina barkeri* (Newton,1993).

Todas las nitrogenasas tienen los mismos requisitos para su actividad catalítica: MgATP, un reductor y un medio ambiente anaeróbico. (Newton,1993). La reacción de fijación de nitrógeno que es catalizada por la nitrogenasa se puede expresar de la siguiente manera:  $ATP + N_2 + 10H^+ + 8e^- \longrightarrow 2NH_4^+ + H_2 + ADP + Pi$ . La reacción requiere un flujo potencialmente bajo de electrones y una hidrólisis de 2 MgATP a MgADP y Pi. Se estima que se hidrolizan dos moléculas de ATP por cada electrón donado al nitrógeno, por lo que puede decirse que el proceso de fijación de nitrógeno es energéticamente caro, ya que se requieren de 16 a 20 moléculas de ATP por cada molécula de nitrógeno fijado (Gallon, 1992).

## SENSIBILIDAD AL O<sub>2</sub> Y ESTRATEGIAS PARA CONTENDER CON EL O<sub>2</sub>

Todas las nitrogenasas sin considerar su origen, muestran una extrema sensibilidad al oxígeno *in vitro*, aunque *in vivo* varía considerablemente (Hill, 1988). Esta variación refleja las diferentes estrategias que utilizan algunos diazótrofos para evitar la inactivación de la nitrogenasa por el oxígeno. Algunos diazótrofos han encontrado formas de contender con el oxígeno, una de estas estrategias es agregarse entre sí como en el caso de *Azopirillum brasilense*, *Derxia gummosa* y *Klebsiella pneumonie* (Hill,1988). Otra estrategia es la presencia de barreras físicas, como las capsulas de polisacáridos, cuya función es prevenir el ingreso del oxígeno como en *Gloeothecce*. (Rippka *etal*, 1979). Otro mecanismo de protección es la formación de heterocistos (células especializadas confinadas para llevar a cabo la fijación de nitrógeno) y vesículas como en el caso de las cianobacterias (Gallon, 1992). Otro mecanismo que protege a la nitrogenasa del oxígeno es la formación de nódulos, estructuras que se encuentran en las raíces y los tallos de las leguminosas. Para poder desarrollar esta estructura, las bacterias endosimbiontes penetran al tejido radicular de la planta vía un "hilo de infección", que a su vez también inducen división celular en el córtex de la raíz dando lugar al tejido que va a generar el nódulo (Morrison y Verma ,1987). Una vez que las bacterias entran en la célula, se desarrolla una membrana peribacteroidal

sintetizada por la planta, que engloba a las bacterias, es aquí donde las bacterias se diferencian a una nueva forma denominada bacteroide (Kondorosi y Kondorosi,1986). Estudios hechos con microelectrodos en el nódulo han mostrado variaciones en las concentraciones de oxígeno dentro de éste (Witty y Minchin 1990). Se ha observado que el córtex del nódulo funciona como una barrera física.

Otras estrategias para evitar el daño por oxígeno son: la protección conformacional y la protección respiratoria. La protección conformacional es un mecanismo que involucra la asociación de la nitrogenasa con proteínas protectoras. Cuando un cultivo de *Azotobacter* se expone brevemente a altas concentraciones de oxígeno, la fijación de nitrógeno se se inhibe por un mecanismo de apagado (*switch-off*), sin embargo, cuando la concentración de oxígeno disminuye, toda o parte de la nitrogenasa se recupera rápida y activamente aún en ausencia de síntesis de proteínas, (mecanismo de encendido *switch-on*) (Gallon, 1992). La protección respiratoria es un fenómeno que se ha observado en *Azotobacter vinelandii*. Cuando este diazótrofo se encuentra en concentraciones elevadas de oxígeno, incrementa su velocidad de respiración reduciendo el oxígeno en forma de agua. Su velocidad de respiración se ve elevada debido a que aumenta la actividad de la enzima NADH deshidrogenasa y el citocromo d. Estos datos sugieren que al estar regulada la concentración de oxígeno, el citocromo *d* provee protección respiratoria (Kelly,1990).

## GENERALIDADES DE RHIZOBIUM

El género *Rhizobium* comprende varias especies de bacterias gram negativas, aerobias estrictas. Este género infecta las raíces de plantas leguminosas donde induce la formación de nódulos y en éstos se lleva a cabo el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno.

Las investigaciones dirigidas a estudiar la interacción planta-bacteria han permitido definir diferentes genes bacterianos que son importantes para el establecimiento de una simbiosis efectiva. Algunos de estos genes están involucrados en la nodulación (genes *nod*) y en la fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*.) . Estos incluyen los genes estructurales que codifican para la enzima nitrogenasa (genes *nifHDK*). En la mayoría de las especies estudiadas, estos genes están localizados en un megaplásmido (Banfalvi *et al*,1981; Rosenberg *et al*,1981).

Cabe mencionar que también existen otros genes que intervienen en diferentes procesos que de alguna manera afectan pasos específicos de la simbiosis, como son los genes involucrados en la síntesis de

exopolisacáridos (genes *exo*) y de lipopolisacáridos (genes *lps*) (Noel,1992).

## EL PROBLEMA DEL OXIGENO

Con anterioridad se describió que altas tensiones de oxígeno inactivan la nitrogenasa, sin embargo, éste es una paradoja porque si bien la nitrogenasa se inactiva por el oxígeno, éste a su vez es requerido por los bacteriodes. Es importante recordar que *Rhizobium* es un aerobio estricto, por lo que ha desarrollado diferentes estrategias que le permiten proteger a la nitrogenasa del oxígeno. Además del córtex que es una barrera física, se encuentra una hemoproteína acarreadora de oxígeno, que facilita la difusión de este gas a los bacteroides, así como la síntesis de ATP, mantenido a su vez una concentración de oxígeno libre no tóxica para la nitrogenasa (Wittenberg *et al*,1974). Esta proteína es conocida como leghemoglobina.

La leghemoglobina es una molécula interesante, ya que la parte globina es sintetizada por la planta (Appleby,1984) mientras que el grupo hemo parece generarse por cooperación metabólica entre ambos simbioses (Obrian *etal*,1987; Obrian y Maier,1989).

## LA RESPIRACION BACTERIANA

La respiración bacteriana es un proceso de transferencia de equivalentes reductores, desde un reductor hasta un oxidante a través de una serie de componentes asociados a la membrana plasmática (Jones, 1988). Este proceso está ligado a una translocación de protones (H<sup>+</sup>) hacia el lado exterior de la membrana plasmática, conservándose la energía libre de las reacciones de oxidación y reducción de la cadena respiratoria, en forma de un potencial electroquímico o fuerza protomotriz. De esta fuerza dependen algunas reacciones tan importantes como la síntesis de ATP, el transporte activo de solutos y la transferencia reversible de electrones (Anraku y Gennis, 1987; Anraku, 1988).

Las bacterias aeróbicas tienen generalmente la capacidad de crecer en diferentes tensiones de oxígeno (Haddock,1977). Esto es posible gracias a la expresión de diferentes oxidasas terminales con distintas afinidades por el oxígeno. El poder reductor generado en el catabolismo de los compuestos de carbono es canalizado a la poza de quinona localizada en la membrana plasmática. De aquí, los electrones son transferidos a las oxidasas terminales localizadas en la membrana plasmática, sitio donde se lleva a cabo la reducción de oxígeno.

La respiración en *Rhizobium* tiene un papel fundamental en la fijación de nitrógeno y en la simbiosis bacteroide-planta. La respiración bacteriana está íntimamente ligada a la fijación simbiótica de nitrógeno de dos maneras: 1) acoplada a la fosforilación oxidativa proporciona el ATP necesario para catalizar la reacción de fijación de nitrógeno (16 a 20 ATP por cada molécula de nitrógeno reducido) y 2) como un posible mecanismo de protección, ya que abate los niveles de oxígeno, evitando la inactivación de la nitrogenasa por este gas. (Appleby, 1984) La fijación simbiótica de nitrógeno se lleva a cabo en tensiones de oxígeno extremadamente bajas, por lo que se propone que en estas condiciones opera una oxidasa terminal con alta afinidad por este elemento que además debe estar eficientemente acoplada a la síntesis de ATP.

### COMPOSICION DE LAS CADENAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

El estudio de la composición de la cadena de transporte de electrones se ha llevado a cabo en diferentes especies de Rhizobiaceas, como: *R. etli*, *R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum*, por citar a algunos. Sin embargo, en donde mejor se han caracterizado es en *B. japonicum* por lo que me enfocaré a describir ejemplos en este endosimbionte así como cuando sea el caso en otros microorganismos.

*Rhizobium* en vida libre comprende citocromos tipo b y c, además de dos oxidasas terminales aa<sub>3</sub> y o (Appleby 1969; Soberón *et al*, 1989). En *R. etli* éstos últimos fueron identificados por espectros de fotodisociación (Soberón *et al*, 1989). En *B.japonicum* los citocromo o y aa<sub>3</sub> también fueron identificados por la misma técnica (Appleby, 1969). El citocromo aa<sub>3</sub> fue identificado como oxidasa terminal en células aeróbicas, pero no se ha encontrado en bacteroides (Appleby, 1984).

Por otra parte, en *R. etli* se ha visto que se expresa el citocromo d en condiciones de aireación restringida, aunque su función como oxidasa no está bien establecida (Barquera, 1991) como en otra especies bacterianas. El citocromo d tiene una alta afinidad por oxígeno, este hecho sugiere que podría tratarse de una oxidasa terminal. (Barquera, 1991). Sin embargo, es importante mencionar que en *B.japonicum* no se ha encontrado citocromo tipo d (Barquera, 1991). En anaerobiosis, en cultivos no agitados y en simbiosis *B.japonicum* no expresa el citocromos aa<sub>3</sub> (Avisar,1978). No obstante, cepas de *B.japonicum* de un grupo de homología diferente (tipo II) expresan citocromos o y aa<sub>3</sub> en simbiosis (Keister y March, 1990). Se sabe que el citocromo aa<sub>3</sub> puede aceptar un flujo mayor de electrones que el que

puede aceptar el citocromo o (Avisar, 1978). Se sabe que el citocromo o de *B.japonicum* tiene mayor afinidad por el oxígeno que aa<sub>3</sub>. La oxidasa terminal aa<sub>3</sub> es similar en estructura y función a la oxidasa terminal mitocondrial. Como en la mitocondria, la oxidasa terminal aa<sub>3</sub> de bacterias, recibe los electrones de un complejo respiratorio que cataliza la transferencia de electrones de la poza de quinonas a la oxidasa terminal (Appleby, 1984) (ver Fig.1). El complejo bc<sub>1</sub> en la mayoría de las bacterias estudiadas consiste de la proteína hierro-azufre Rieske, el citocromo b y el citocromo c<sub>1</sub>. Las apoproteínas son codificadas por los genes *fbcF*, *fbcB* y *fbcC* respectivamente (Hennecke, 1991). No obstante, la organización genética de este complejo en *B.japonicum* es diferente ya un sólo gene (*fbcH*) codifica para dos proteínas individuales (citocromo b y c<sub>1</sub>) y un segundo gene (*fbcF*) codifica para la proteína Rieske-hierro azufre. Ambos genes forman el operon *fbcFH* (Thony-Meyer *et al*, 1989).

En cultivos aeróbicos de *B.japonicum* se ha observado que el complejo aa<sub>3</sub> recibe electrones de la ubiquinol, vía el complejo bc<sub>1</sub> y de un citocromo c unido a la membrana (Bott *et al*, 1990). Además, se mostró que el complejo bc<sub>1</sub> se requiere para el establecimiento de una simbiosis efectiva (Thony-Meyer *et al*, 1989; Bott *et al*, 1991). Existe la expresión de otro citocromo (CycM). El genecycM es una unidad estructural que codifica para un citocromo tipo c; este citocromo es homólogo a un citocromo c soluble mitocondrial el cual presumiblemente está involucrado en la transferencia de electrones de bc<sub>1</sub> a la oxidasa terminal aa<sub>3</sub> (Bott *et al*, 1991). Sin embargo, mutantes en *cycM* forman nódulos efectivos; ésto permite sugerir que la cadena respiratoria se ramifica a nivel de bc<sub>1</sub> donde otro citocromo c está involucrado durante la simbiosis (Bott *et al*, 1990).

Se ha descrito por análisis de secuencia cuatro genes organizados en el operón *coxMNOP*. El gene *coxM* presenta una significativa similitud a la subunidad II de la citocromo oxidasa c de algunos organismos. El gene *coxN* codifica para un polipéptido con cerca de un 40% de identidad con la subunidad I incluida en la proteína *coxA* (este es el gene estructural de la subunidad I del citocromo aa<sub>3</sub>). Los productos de los genes *coxO* y *coxP* son similares a la subunidad III de la oxidasa aa<sub>3</sub> (Bott *et al*, 1992). En otras palabras, estos genes forman una oxidasa alternativa (Hennecke *et al*, 1994), probablemente codifica para el citocromo o.

Recientemente Hennecke y colaboradores (1994) han descrito un nuevo operón en *B.japonicum*, el *fixNOQP*. Del análisis de la secuencia se deduce que los genes *fixNOQP* codifican para una citocromo oxidasa del tipo

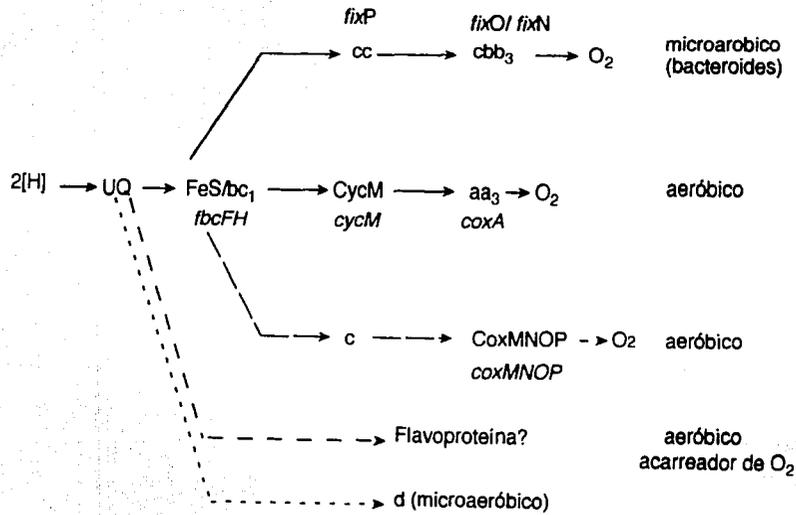


Fig.1 Modelo propuesto para las cadenas respiratorias de *Bradyrhizobium japonicum*. Tomado de Hennecke, et al 1994.

c que contiene un grupo hemo-cobre y que está unida a la membrana plasmática. Ya se identificaron los productos de los genes *fixN*, *fixO* y *fixP*; el producto del gen *fixQ* no se ha identificado aún. Cabe mencionar que estos genes se inducen en condiciones limitantes de oxígeno (Hennecke *et al*, 1994). Los genes *fixNOQP* se han reportado en *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *biovar viciae*, y en *A. caudolinodans* (Khan *et al*, 1993; Preisig *et al*, 1993; Schultzer *et al*, 1993; Mandon *et al*, 1994). Se ha propuesto que estos genes codifica para una oxidasa terminal simbiótica.

Los citocromos tipo c llevan como grupo prostético un hemo unido covalentemente a la apoproteína. Las holoproteínas maduras están localizadas hacia el periplasma de la membrana citoplasmática bacteriana. Los polipéptidos precursores de la estructura primaria de los citocromos tipo c muestran dos características principales: una secuencia señal N-terminal típica de exportación, y un motivo formado por dos cisteínas que flanquean a dos aminoácidos cualquiera del sitio para la unión covalente del grupo hemo (C-X-X-C-). La maduración involucra traslocación del precursor a través de la membrana y la unión covalente del hemo (Thony-Meyer *et al*, 1994).

Existen evidencias de que los citocromos tipo c son importantes durante la simbiosis. Se han descrito mutantes en *loci* involucrados en la biogénesis de los citocromos tipo c, las cuales son incapaces de fijar nitrógeno atmosférico. Uno de estos *loci* está compuesto por tres genes: *cycV*, *cycW*, *cycX* los cuales están presumiblemente involucrados en el transporte del hemo c a la membrana y/o al periplasma. Las mutantes en *cycV*, *cycW* o *cycX* no fijan nitrógeno; estas mutaciones tienen un efecto pleiotrópico sobre la expresión de todos los citocromos tipo c (Ramseier *et al*, 1991). Es importante mencionar que en otras bacterias como *Rhodobacter capsulatus* estos genes tiene su contraparte. Esta contraparte son los genes llamados *helA*, *helB*, *helC* y *helD*-(*orf 52*). La contraparte del gene *helC* es el *orf263*; mutaciones en este marco abierto de lectura (ORF) tienen un fenotipo similar al silvestre (Ramseier *et al*, 1991), no obstante, mutantes en *helC* resultan en un fenotipo citocromo c- (Kranz, 1989). La contraparte de los demás genes corresponden a *cycV*, *cycW* y *cycX* respectivamente en *B.japonicum*. El comportamiento de las mutantes *hel* en *R. capsulatus* es el mismo que para *B.japonicum*, es decir, en ambos casos dichas mutaciones tienen un efecto específico en la expresión de los citocromos tipo c (Kranz *et al*, 1993).

Un aspecto de interés en este campo es estudiar la biogénesis de los citocromos tipo c. Se ha propuesto que el gene *cycH* de *B. japonicum* está involucrado en la biogénesis de la mayoría de los citocromos tipo c

(Hennecke *et al*, 1993). Se propone que este gene podría ser una hemoliasa o una subunidad de un complejo hemoliasa diferente de las conocidas en eucariontes. Alternativamente, se piensa que *cycH* podría funcionar como una chaperonina. Es importante señalar que mutantes en este gene no fijan nitrógeno y tienen niveles reducidos de citocromo c. En *R. capsulatus* se ha analizado un segundo locus de genes (*cc11* y *cc12*) que podrían estar involucrados en la biogénesis de los citocromos tipo c (Beckman *et al*, 1992). El gene *cc11* codifica para una proteína integral de membrana que es homóloga a ORF's mitocondriales así como de cloroplastos (Beckman *et al*, 1992). *cc12* se predice que puede ser una proteína periplásmica que tiene una señal consenso en el N-terminal (Beckman y col., 1992), Análisis genéticos de una mutante *cc11*, con una proteína híbrida citocromo-c2 fosfatasa alcalina mostró que esta proteína fue traslocada al espacio periplásmico por lo cual el autor especula que la función de la proteína que codifica el gen *cc11* no es la exportación de citocromos tipo c y que puede ser un citocromo c hemo liasa, o como una chaperonina periplásmica , o estar involucrado en modificaciones necesarias del apocitocromo c o el hemo (Beckman, et al 1992). Kranz y colaboradores (1993), reporta que otro gene *helX* de *R. capsulatus*, es esencial para la biogénesis del citocromo c. Delecciones en este gene hace que no pueden crecer fotosintéticamente. (Kranz et al 1993). Ellos también demuestran que *helX* codifica para una proteína periplásmica que no se requiere para la síntesis o secreción del apocitocromo c2 a el periplasma. (Beckman et al 1993). La proteína HelX es significativamente similar a varias thiorodoxinas de plantas y algas, además de las proteínas bacterianas de *Escherichia coli* aDsbA (Bardwell,etal 1991) y *Vibrio cholerae* TcpG.(Peek etal 1992) Las thiorodoxinas con las que *helX* muestra similitud son miembros de una clase de proteínas periplasmicas requeridas para la formación de enlaces disulfuro durante la maduración de algunas proteínas secretadas. (Kranz et al 1993). Por lo que la función de *HelX* podría ser la reducción de los tioles de las cisteínas de las apoproteínas que pegan al hemo ( Beckman, et al 1993).

## ANTECEDENTES y OBJETIVO

Como se ha mencionado a lo largo de este texto la respiración bacteria es un proceso tiene un papel fundamental en la fijación de nitrógeno. Al estar acopladas la fosforilación oxidativa de la bacteria, ésta le proporciona a la nitrogenasa los ATP necesarios para la reacción de fijación de nitrógeno.

Es de nuestro interés conocer más acerca de la relación entre los procesos de respiración y de fijación de nitrógeno. En el laboratorio contamos con diferentes mutantes de *Rhizobium etli* que tienen afectada la expresión de los citocromos de la cadena respiratoria. Estas mutaciones inciden directamente de manera particular en la simbiosis con el frijol. Algunas de nuestras mutantes tienen capacidad incrementada de oxidar el colorante tetrametil-para-fenilendiamina (TMPD), (TMPD<sup>++</sup>); otras no tienen la capacidad para oxidarlo (TMPD<sup>-</sup>). Una de las mutantes es la cepa IFC01. La cepa IFC01 se obtuvo a partir de la cepa CE3 por inserción del transposón Tn5-mob y se identificó por su incapacidad para virar el TMPD. Se comprobó que la inserción del Tn5-mob fue la responsable del fenotipo TMPD<sup>-</sup> (García,1992). El análisis de citocromos llevados a cabo para la cepa mutante IFC01 demostraron que esta no presenta citocromos tipo c y presenta escasa señal de los citocromos aa<sub>3</sub> en espectros. Su fenotipo simbiótico es Fix<sup>-</sup> (no fija nitrógeno), Nod<sup>+</sup> (nodulación positiva), Inf<sup>+</sup>-(hay infección pero hay pocos bacteroides).

Dado el perfil bioquímico y genético que presenta la mutante IFC01 nuestro objetivo principal, es caracterizarla molecularmente ya que nos permitirá conocer los elementos que participan en la regulación o la biogénesis de estos citocromos tipo c y así poder establecer cual es la función de los citocromos tipo c en *Rhizobium etli*.

Para el presente objetivo decidimos llevar a cabo la siguiente estrategia experimental.

- a) Clonación del gene mutado y del gene silvestre
- b) Secuenciación del gene clonado para su análisis y comparación en banco de datos.
- c) Análisis y complementación de mutante CFN4202 aislada en nuestro laboratorio.

## RESULTADOS

### CARACTERIZACION DE LA INSERCIÓN DE Tn5 DE LA CEPA IFC01

Con el propósito de confirmar los datos previamente reportados de que la cepa IFC01 contenía una sola inserción del transposón Tn5, (García,1990), se purificó DNA total de la cepa CE3 y de la cepa mutante IFC01 y se hizo una hibridación tipo Southern usando al Tn5 como sonda (contenido en el plásmido pSUP5011). Los DNAs totales digeridos con la enzima *Xho*I, al hibridarlos generaron cuatro fragmentos únicamente cuyos

pesos moleculares fueron: 6.2, 3.9, 2.2 y 1.5 kb. Dos de éstos provienen de Tn5 (2.3 kb y 1.5 kb) y los otros dos fragmentos contienen 400 pb de los extremos del Tn5 más el DNA bacteriano aledaño al sitio de inserción; estos datos confirman que la cepa IFC01 contiene una sola inserción del transposon Tn5 en su cromosoma. Fig(2).

## COMPOSICION DE CITOCROMOS

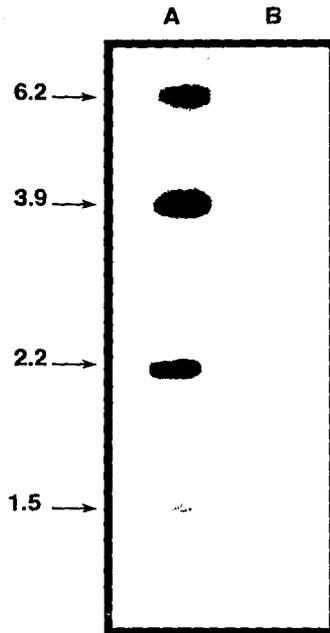
Con la finalidad de conocer más acerca de la composición de los citocromos tipo c de las cepas silvestre y mutantes de *R. etli*, decidimos hacer un análisis más detallado de las mismas. Se hicieron preparaciones de membrana de ambos tipos de cepas, mismas que se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes. La presencia de los citocromos tipo c en el gel se detectó aprovechando su capacidad para oxidar el luminol (actividad de peroxidasa). Nuestros resultados mostraron que la cepa IFC01 no expresa citocromos tipo c (ver Fig. 3, carril B), a diferencia de la cepa CE3 y la cepa IFC01 complementada (IFC01/pML60), que expresan tres proteínas cuyos pesos aparentes fueron: 37, 30 y 20 kd.

## CLONACION DEL GENE RESPONSABLE DEL FENOTIPO TMPD-

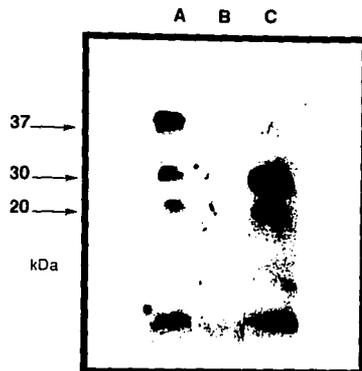
El primer paso para poder caracterizar molecularmente la cepa IFC01 fue la clonación del gene responsable del fenotipo TMPD-, así como del gen silvestre correspondiente. Esto nos permitiría obtener su secuencia nucleotídica y deducir cual podría ser su función. Para ello seguimos la siguiente estrategia.

### a) Clonación del gene mutado

Para lograr este propósito se decidió digerir el DNA de la cepa IFC01 con la enzima *EcoRI* y clonar estos fragmentos en el vehículo pSK (debido a que no se encuentran sitios de restricción *EcoRI* en el transposon Tn5). Se pudo obtener una clona capaz de crecer en ampicilina y kanamicina (las clonas que contenían resistencia a kanamicina son candidatas a llevar insertado el Tn5) el tamaño del fragmento *EcoRI* es de 10.3 kb (clona pGMS3) Fig.(4). Usando oligonucleótidos específicos del Tn5 podremos obtener secuencia nucleotídica e identificar el gene mutado. Este fragmento *EcoRI* de 10.3 kb se usó para la clonación del gene silvestre.



**Fig. 2** Hibridación tipo Southern blot.  
Sonda usada Tn5. Ambas cepas fueron digeridas en *Xho*I.  
**A.** cepa mutante IFC01 **B.** cepa silvestre (CE3)



**Fig.3** Análisis electroforético en geles de poliacrilamida desnaturalizante y tinción de grupo hemo de proteínas de membrana. **A.** cepa silvestre CE3. **B.** mutante IFC01. **C.** IFC01/ pML60 cepa mutante complementada.

## b) Clonación del gene silvestre

Con la finalidad de clonar el gene silvestre se hizo una hibridación en colonia utilizando un banco genómico de la cepa CE3 el cual contiene fragmentos provenientes de una digestión parcial con *EcoRI* de DNA total clonado en pLARF1 (Friedman *et al*, 1982 ), usando como sonda el fragmento que contiene el gene interrumpido por Tn5. Después de la hibridación, se seleccionaron algunas candidatas y se procedió a hacer el aislamiento del cósmido putativo. Los cósmidos se digirieron con la enzima *EcoRI* con el objeto de identificar el cósmido que contenga un fragmento *EcoRI* que hibride con la sonda pGMS3.

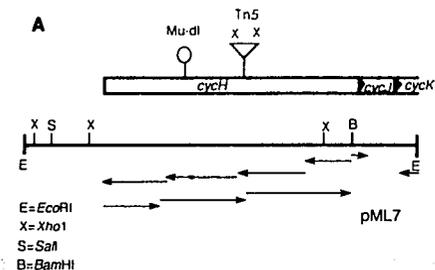
Encontramos un sólo cósmido que contuvo una banda de 2.8 kb que hibridó con esta sonda y además complementó el fenotipo TMPD<sup>-</sup> de la cepa mutante IFC01 (cósmido pML394 ) (ver sección de complementación genética).

Con la finalidad de secuenciar el gene silvestre, la banda de 2.8 Kb fue subclonada en el vector pKS bluescript (Stratagene) (clona pML7). Para poder introducir este gene a *Rhizobium* fue necesario subclonar esta banda en un vector replicable en esta bacteria el pRK78713 (Jones *et al*, 1987); al resultado de esta clonación se le denominó pML60.

## COMPLEMENTACION GENETICA

El cósmido pML394 se introdujo por conjugación a la cepa mutante IFC01 obteniendo como resultado que la cepa IFC01 recuperó el fenotipo TMPD<sup>+</sup> silvestre. Lo mismo sucedió con el plásmido pML60. Como se observa en la Fig 5 la cepa IFC01 permanece leuca mientras que las transconjugantes y la cepa silvestre fueron capaces de oxidar el colorante TMPD, lo cual nos permite sugerir fuertemente que el fragmento de 2.8 kb lleva el gene completo. Una vez demostrado que el gene silvestre fue capaz de complementar el fenotipo TMPD<sup>+</sup>, fue necesario comprobar si también complementaba el fenotipo simbiótico.

Para observar el fenotipo simbiótico las cepas IFC01\pML394, IFC01/pML60 la cepa silvestre CE3 y la mutante IFC01 se crecieron por 24 hr. Estos cultivos fueron utilizados para inocular frijoles con tres días de germinación. Después de 21 días de crecimiento en el invernadero analizamos las plantas. Como se observa en la Fig 6 las plantas inoculadas con las cepas silvestre y complementadas, presentan en la parte radicular nódulos bien formados de color rosa; en la parte aérea las



**B**

|        |     |             |             |              |              |            |
|--------|-----|-------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| bjcyeh | 1   | MTLWTFALM   | TYAIFAVLM   | PLGRSAR..A   | QNOGSEVVVY   | KDOLTEIERS |
| rcyeh  |     | MLFWILVAIL  | TAAVAALLL   | PLMRSAEPLP   | SRHSHDIEVY   | RDQGLGLARD |
| pdcyeh |     | ..MFWICAAAL | AGVWVPNSA   | PLLARQARRE   | PAAAVDLAIY   | RDQLREVERD |
| rcyeh  |     | .....T      | SSANSTRYCW  | RAD.....     |              |            |
|        | 51  | LASGLIAAPE  | AEAARVEISL  | RLIWA..AGSE  | PVSEPKSS..L  | KWRRAAAVLA |
| bjcyeh |     | REACLIGSEE  | AELARAEIYR  | RHLASAADO    | AVAZPTPKRL   | LSNRLAQAFI |
| rcyeh  |     | LERGVDAAD   | ASGLVLEIYR  | ..DC         | APGHRFAPG    | ARRGHAALLL |
| pdcyeh |     | .....DARR   | GCYAOAKSRE  | ..LIMVSAAP   | OTTOKPARH..  | ..HRLTEVLV |
|        | 101 | LWVPLVAIG   | VYHPIEPR    | ODPFLLA..... | Q            | REKGGSSQPA |
| bjcyeh |     | FLQIPAVGLC  | LYLITIEPGV  | PAOPLA.....  | A            | SLADPG...  |
| rcyeh  |     | LAAQLGGAFI  | TYOGLIDPDS  | TDAPIALDRP   | GAGALROFFO   | RDRCRGAGPO |
| pdcyeh |     | LLIILVGLC   | LIPLDLEAGS  | AI.....      |              | ..AACNR    |
| rcyeh  |     |             |             |              |              |            |
|        | 151 | GS.....L    | ENLVVUVELM  | LEKHPDCHN    | KNVILAPV..IE | ALRFQDAVR  |
| bjcyeh |     | DD.....V    | HILTAFAEIN  | LALNPDDGAI   | WDLLAPI..YH  | RYRLDDAVA  |
| rcyeh  |     | DRDARSRCR   | CRDPSAAEA   | VQWHPDPR     | LELLAEH..IE  | RLMLVAARD  |
| pdcyeh |     | RGMKIPATW   | PVLIAARNGI  | WPRTEPTARI   | ..DVLAPIYFA  | RLSHMARCL  |
| rcyeh  |     |             |             |              |              |            |
|        | 201 | MYRSITYNS   | EVFHSNDLIL  | ..KAISAAAI   | GVVTAFAKTE   | FERAHALNAD |
| bjcyeh |     | YDRAIRILG   | PTPAHGGYA   | ..EALVAQAI   | GLVTAFAQNA   | LQKALALND  |
| rcyeh  |     | QHLVAARG    | ESORHCSGAA  | GRGLTIVAAG   | GIISRQGEA    | VAQALARVAR |
| pdcyeh |     | QR.....     | DPAAHSPIR   | LDGVAEADCI   | LPWRRDRGA    | PQGTITADAG |
| rcyeh  |     |             |             |              |              |            |
|        | 251 | DPKANYFLG   | AAEGMRKDD   | AATIWRALLA   | K..ADALTPR   | RPLVQSHLVR |
| bjcyeh |     | DIPSAIYLA   | CLKQGRHAE   | ALAAAFKLAE   | S..SPACAPL   | LSLVNCHIAE |
| rcyeh  |     | NPOARPAAL   | LHLONGRPO   | AFPVWARLLA   | E..GRENAPM   | IAPITRSIQD |
| pdcyeh |     | TOGSACPL    | LRRAQHGAGS  | GRGRARFEG    | QOOSPADEW    | PLVYVNGPR  |
| rcyeh  |     |             |             |              |              |            |
|        | 301 | VG.....     | GGTPAL..... | ..SDETIAAS   | KMREGDRGA    |            |
| bjcyeh |     | VA.....     | ADAPGAPAE   | NPAGDIIAA    | KWAGDQDA     |            |
| rcyeh  |     | SGLVCRPPGL  | YPARTEPLW   | TPQMPSLPAH   | PGPDADDGRA   | EETAEERDE  |
| pdcyeh |     | .....       | TAAMPSPAAS  | SPTSEDEAAA   | ESLQAGDPOO   |            |
| rcyeh  |     |             |             |              |              |            |
|        | 351 | YVYVVERIA   | TRLKONSDDV  | EGELVLVRY    | IVYHNDRKAV   | GASSDRAOAV |
| bjcyeh |     | YRHWVDSLA   | SRLKEDPANL  | EGVRLVRSY    | VLDORDRAK    | DALHDGLRAF |
| rcyeh  |     | YVYVNGLE    | TRLATODGTA  | EMARLISSL    | YVYVQNDHAA   | DILAEARROF |
| pdcyeh |     | YVYVNSLD    | AKLRQDPNNF  | EDVRLVLYL    | AVLDNDRAK    | A..PEAACPF |
| rcyeh  |     |             |             |              |              |            |
|        | 401 | AMDTLRRLQ   | NEGLKTIHLD  | G.....       |              |            |
| bjcyeh |     | PATGEQKQL   | LALARELGID  | AGGAAE       |              |            |
| rcyeh  |     | AGMHWKSS    | EAARAGLIE   |              |              |            |
| pdcyeh |     | PPSGEQCHOL  | LRYHESHMCT  | ECHTO.       |              |            |
| rcyeh  |     |             |             |              |              |            |

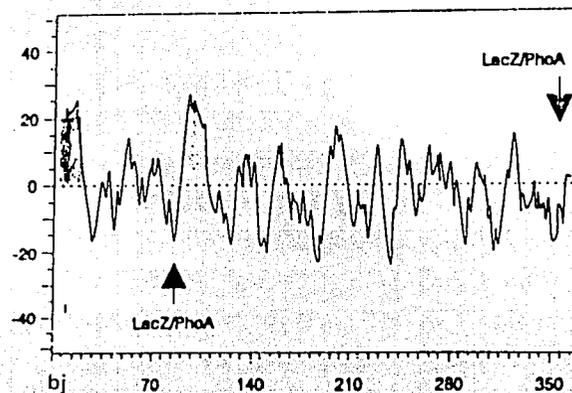
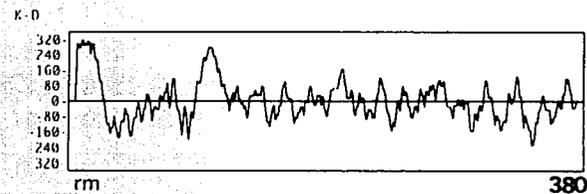
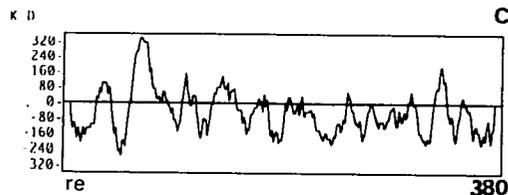
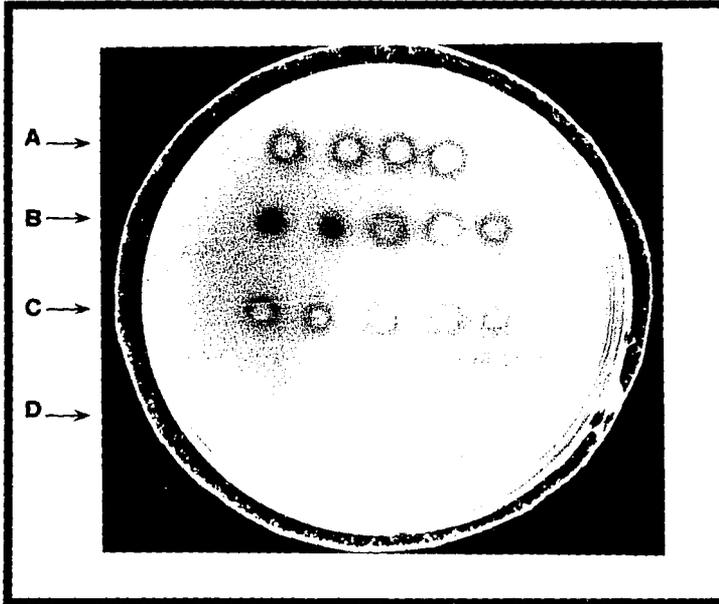


Fig 4. A. Mapa físico de la región *cycH* de *R. etli*. Mostramos la posición del Mu-dI y del Tn5. B. Alineamientos de Cych en aa de diferentes bacterias, b, *Bradyrhizobium japonicum*; rm *Rhizobium meliloti*; pd, *Paracoccus denitrificans*; re, *Rhizobium etli*. C. Comparación de tres perfiles hidropáticos de distintos Cych.



**Fig.5** Análisis TMPD oxidasa en placa de medio mínimo después de 3 días de crecimiento a 30°C. **A.** CE3 cepa silvestre. **B.** IFC01 complementada con el plásmido pML60. **C.** IFC01 complementada con el plásmido pML394. **D.** IFC01 cepa mutante

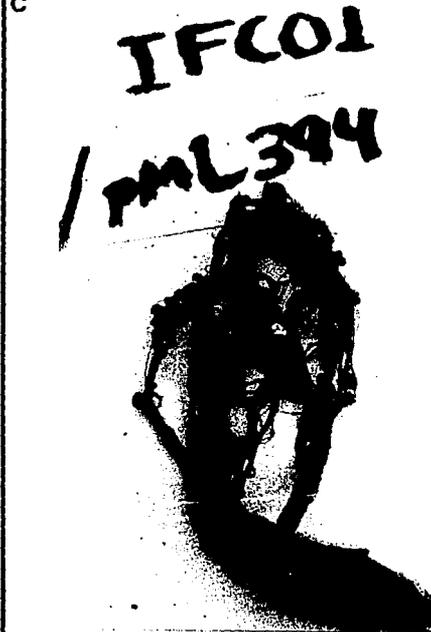
A



B



C



**Fig. 6 A.** Corresponde a plantas de *Phaseolus vulgaris* con *Rhizobium etli* mutante IFC01 complementada con pML394, CE3 cepa silvestre, e IFC01 mutante. **B.** Parte radicular mostrando la forma y tamaño de los nódulos en la mutante IFC01. **C.** Parte radicular mostrando la forma y tamaño de los nodulos en la mutante complementada IFC01/pML394, todas las fotografías fueron después de 21 días de crecimiento en invernadero.

hojas fueron de color verde, mientras que las plantas inoculadas con la cepa mutante presenta nódulos verdes, y en la parte aérea las hojas eran de color amarillo. Con estos datos concluimos que así como el fenotipo TMPD<sup>+</sup> fue recuperado también lo fue el fenotipo simbiótico.

Los espectros para la cepa IFC01 complementada con el pML60 mostraron los picos característicos de las cepas silvestre (CE3) Los picos mínimo y máximo para los citocromo tipo c fueron de 523 nm y 552 nm, respectivamente. Para los citocromos tipo b se observó un hombro a 530 nm y un pico a 561 nm. También se observó un pico de (603 nm) para el citocromo aa<sub>3</sub> Fig.(7).

## DETERMINACION DE LA SECUENCIA DE DNA

En el fragmento *Eco*R1 de 2.8 kb se encuentra contenido el gene mutado de nuestro interés el cual se secuencio con la siguiente estrategia Fig .(4)

A partir del plásmido pGMS3, se subclonaron los fragmentos comprendidos entre el sitio *Xho*I del gene y el primer sitio *Xho*I del Tn5 (plásmido pML15). El fragmento comprendido entre el último sitio *Xho*I del Tn5 para dar origen al plásmido (pML25). De este último plásmido, se obtuvieron las subclonas *Xho*I/*Bam*HI (pML25X/B) y *Bam*HI/*Eco*R1 (pML25B/E). Cabe mencionar que con las subclonas pML15 y pML25 usamos el primer que hibrida con el extremo del Tn5 para determinar parte de la secuencia nucleotídica del gene interrumpido lo cual nos permitió identificarlo por medio de alineamientos Además de determinar la secuencia, nos permitió diseñar nuevos oligonucleotidos para concluir la . ver Fig(4)

Una vez obtenida la secuencia de 1031 pb que corresponde al primer marco de lectura (ORF) se comparó con el banco de datos (Genbank). De esta comparación obtuvimos una similitud con el gene *cycH* de las bacterias *B.japonicum*, *R. meliloti* y *Paracoccus denitrificans* la primera reportada por el grupo de Hennecke. (1993) y las dos siguientes los datos fueron obtenidos del GenBank ( No. de acceso x82560, y z36942) respectivamente. Con la bacteria *B.japonicum* mostró una identidad de 31 %, con los cambios conservativos incluidos fue de 54 % . Los datos obtenidos contra *R. meliloti* mostraron una identidad mayor de 59 % y con los cambios conservativos su identidad fue de 36 %. En *Paracoccus denitrificans* presentó una similitud de 45% y con los cambios conservativos fue de un 45%. En segundo ORF encontrado corriente abajo

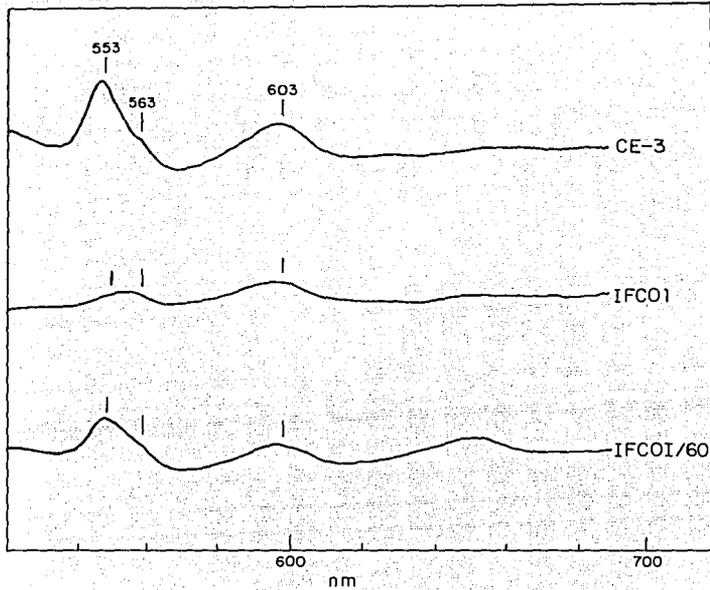


Fig 7. Espectros diferenciales (ditionita-reducido menos persulfato oxidado) de células completas después de 18 hrs de crecimiento. CE3 (cepa silvestre), IFCO1 (cepa mutante), IFCOI/ pML60 (cepa complementada).

del gene *cycH* de *R. etli* mostró, también una gran similitud con las secuencias reportadas en ambas cepas, *B. japonicum* y *R. meliloti*, en dichas cepas estos genes *cycHJKL* se encuentran formando un operón. En *R. etli* creemos que se encuentran de la misma forma, debido a la presencia de un segundo ORF que mostró una identidad de 58% y de 70% cuando se tomaron en cuenta los cambios conservativos esto contra la comparación el gene *cycJ* de *B. japonicum*. Es importante mencionar que esta similitud es desde la metionina de ambas cepas.

Mientras que con *R. meliloti* la identidad es mayor, esta fue de un 66% y un 80% cuando se incluyeron los cambios conservativos. Por ultimo encontramos un tercer ORF incompleto. Sin embargo contamos con el primer residuo de la traducción, metionina, aunque solo tenemos 300 pb fueron suficientes para obtener la comparación, la cual mostró una identidad de 47% y 64% considerando los cambios conservativos, contra el gene *cycK* de *B. japonicum*, una identidad de 52% y 80% con el gene *cycK* con *R. meliloti*. Además nos dió una tercera similitud con el gene *ccI1* en *Rhodobacter capsulatus* esta con una identidad de 42% y 67% tomando en cuenta los cambios conservativos.

## COMPLEMENTACION GENETICA DE LA CEPA CFN4202

La mutante CFN4202 (que fue inducida con Mu-dI(Kan-lac) (Soberón,1993)), es incapaz de oxidar el colorante TMPD, además, contiene seis veces menos citocromo hemo c, aunque en los niveles de citocromos tipo b, o y aa<sub>3</sub> es similar a la cepa silvestre. Con el fin de esclarecer si la mutación interrumpe al mismo gene que afecta la mutante IFC01, o se localizaba en un gene contiguo, o incluso en otro locus, se planearon las siguientes estrategias experimentales.

Llevamos a cabo el mismo experimento de complementación, con la cepa CFN4202 esto con los plásmidos pML394 y pML60 y que habían sido utilizados para complementar a la cepa IFC01.

El resultado fue que el cósmido pML394 sí complemento el fenotipo TMPD de la cepa CFN4202. sin embargo el plásmido pML60 no fue capaz de complementar la mutación.

No obstante las dos mutantes, IFC01 y CFN4202, son diferentes respecto a su fijación de nitrógeno, hicimos experimentos de invernadero, donde a frijoles crecidos por tres días fueron inoculados con las cepas mutantes, así como las transconjugantes. Una vez inoculadas las plantas, se crecieron por 21 días, después de este tiempo comprobamos que la cepa CFN4202 presentó fenotipo simbiótico Inf-,Nod+/-, Fix-, no se había

recuperado el fenotipo simbiótico aún en la cepa que había sido complementada por el cósmido pML394.

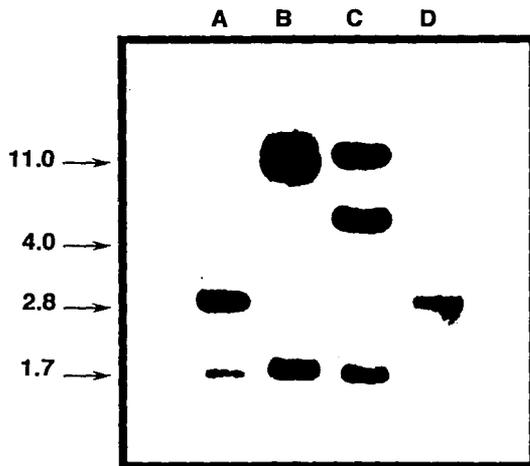
Sin embargo, estos datos de complementación, no fueron suficientes para entender la localización de la mutación CFN4202. De modo que hicimos otros experimentos, con la finalidad de hacer una localización más precisa, del elemento Mu-dl(Kan-*lac*) en la cepa CFN4202. Llevamos a cabo una hibridación tipo Southern donde hibridamos DNAs totales digeridos previamente con la enzima *Eco* R1, cepa silvestre (CE3), la cepa mutante IFC01 y la cepa mutante CFN42402 usando como sonda el fragmento silvestre,(clona pML7).

Como se observa en la Fig 8, carril C el fragmento de 2.8kb también desaparece, como en el caso de la cepa IFC01, Fig 8 carril B; Sin embargo, para la mutante CFN4202 se observan dos bandas, una de 12.6kb (de los cuales 11 kb son de el mu-dl (Kan-*lac*) y el restante del DNA contiguo) y otra de 5.9 kb, 4 son del mu-dl(Kan- *lac*) y el resto de DNA aledaño. Debido a que el fragmento mu-dl(Kan- *lac*) tiene un sitio interno *Eco*R1 nos da estos fragmentos. Estos datos nos confirman que la mutación de la cepa CFN4202 también se encontraba dentro del fragmento de 2.8 kb.

Otro hecho que nos llamó la atención y que se observa en la misma Fig 8 fue que el fragmento de 2.8 kb usado como sonda dió una doble señal de hibridación, este es de un tamaño de aproximadamente 1.7 kb. Dado que nuestro interés está centrado en el gene *cycH* este dato nos hizo pensar que podría estar reiterado. Con el propósito de conocer si el gene *cycH* estaba reiterado, hicimos una segunda hibridación de la cepa silvestre con una sonda intragénica de *cycH* (*R.etli*),e hibridamos DNA total de la cepa CE3 digeridos previamente con la enzima *Eco*R1. El resultado fue que se trataba de una sola copia de *cycH* como se aprecia en la Fig 8 carril D.

Aunque habíamos contestado la pregunta de que el gene *cycH* no estaba reiterado, no contestábamos a que se debía esa señal de hibridación de 1.7 kb. Por lo cual se hizo una nueva hibridación donde se hibridó DNA total de la cepa CE3 y de la cepa CFN4202 digeridos en *Eco*R1 ahora usando como sonda un extremo del fragmento de 2.8 kb es decir un fragmento de aproximadamente 700 pb que se ubica hacia el extremo 3' del gene *cycH* (pML25B/E), del resultado de esta hibridación como se aprecia en la Fig 9, donde además del fragmento de 2.8 kb aparece la banda de 1.7 kb Fig 9, A y B lo cual confirma que la reiteración es debida al fragmento pML25B/E del extremo 3' *cycH*.

Con este mismo experimento pudimos localizar la mutación de la



**Fig. 8** Hibridación tipo Southern blot DNA's totales digeridos con *EcoR*I. **A.** cepa silvestre (CE3) **B.** cepa mutante IFC01. **C.** cepa mutante CFN4202 Usando como sonda el fragmento silvestre de 2.8 Kb. **D.** cepa silvestre (CE3) . Se uso como sonda el fragmento intragénico *cych* de *R. etfi*

cepa CFN4202 cortado con *EcoR1* generó dos fragmentos uno de 12.6 kb y otro de 5.9 kb al usar como sonda la clona pML7 (Fig 8 carril C). Cuando este DNA total se hibridó con el fragmento de 700pb, además del fragmento de 1.7 kb, se observó un fragmento de 5.9 kb. Este fragmento tiene hacia el extremo 5' de *cycH*, 4 kb que pertenecen al Mu-dI (*Kan-lac*) y hacia el extremo 3' de *cycH*, las 1900 pb. Por lo tanto el Mu-dI (*Kan-lac*) se encuentra interrumpiendo el gene *cycH*.

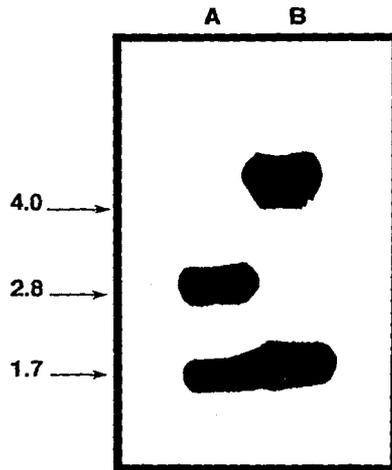
## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En trabajos previos (Soberón et al 1989,90,93) describió la composición de citocromos de la cadena respiratoria de *Rhizobium etli* que comprende citocromos tipo b, c y las oxidasa terminales aa<sub>3</sub> y o.

En esta tesis caracterizamos molecularmente la mutante IFC01 Esta mutante se obtuvo a partir de la cepa CE3 mutagenizada con el transposon Tn5, Por análisis espectrofotométricos se observó que esta mutante presenta ausencia de citocromos tipo c y escasa presencia de citocromos aa<sub>3</sub>. En cuanto a su comportamiento simbiótico es Fix<sup>-</sup>, (una cepa que no fija nitrógeno), Nod<sup>+</sup> (nodulación), Inf<sup>+</sup> (infecta pero hay pocos bacteroides en el interior del nódulo). (García1992)

Por otro lado en este trabajo analizamos a la mutante CFN4202 mutagenizada con Mu-dI(*Kan-lac*) (Soberón, 1993) la cual presenta 6 veces menos citocromos tipo c con respecto a la cepa silvestre CE3, su comportamiento simbiótico fue Fix<sup>-</sup>, Nod<sup>+-</sup>, Inf<sup>-</sup>. Los fenotipos de nodulación y de infección representan una diferencia importante entre las dos mutantes. Ambas mutaciones tanto la de la cepa IFC01(Tn5), como la cepa CFN4202 Mu-dI(*Kan-lac*) interrumpen el gene *cycH* Fig 9. La localización de la inserción del transposón Tn5 en el gene *cycH* de la cepa IFC01 se hizo por el análisis de secuencia del sitio de la inserción del transposon. El fago Mu-dI(*Kan-lac*) de la cepa CFN4202 se ubicó en el gene *cycH* por el mapeo físico de los fragmentos que hibridan contra el fragmento *EcoR1* de 2.8 kb contra el fragmento que contiene el gene *cycJ* (clona pML25B/E).

El sitio donde cayó el Mu-dI(*Kan-lac*) está a 1900 pb del sitio de restricción *EcoR1*. Lo cual sugiere fuertemente que está la mutación en el gene *cycH*. El gene *cycH* es parte de un operón de cuatro genes (*cycHJKL*). En *B. japonicum* y en *R. meliloti*. Se ha propuesto que estos genes codifican para diferentes subunidades de una enzima hemoliasas encargada de pegar covalentemente el grupo hemo en los citocromos tipo c. Es posible que el producto de los genes (*cycHJKL*) codifiquen para una hemoliasa de



**Fig .9** Hibridazion tipo Southern blot.  
A. cepa silvestre (CE3). B. cepa mutante CFN4202.  
Ambas cepas digeridas en *EcoR*I. Usando como sonda  
el fragmento de 700 pb (pMIL25B/E)

citocromo tipo c (CCHL) bacteriana de múltiples subunidades, aunque no se ha encontrado similitud entre los codificados por los genes (*cycHJKL*) y hemoliasas previamente reportadas *Neurospora crassa* y *Sacharomyces cerevisiae*( Dumont et al 1987; Nargarg et al 1988).

A pesar de que ambas mutaciones se encuentran en el mismo gene, y que son complementadas por el plásmido pML394, el plásmido pML60 solo es capaz de complementar el fenotipo TMPD+ a la cepa IFC01. Esto nos hizo pensar que para el caso de la cepa IFC01 se trataba de una mutación no polar ya que el plásmido pML60 solo contiene a los genes *cycH* y *cycJ* completo y no a *cycK* y a *cycL*.

En estudios anteriores se ha visto que de las inserciones Tn5 aproximadamente dos terceras partes son polares y una tercera parte es no polar y causar una expresión constitutiva de genes distales (Berg et al 1980) lo cual explicaría la diferencia de la cepa CFN4202 cuya mutación si es polar y por lo tanto no es complementada por los genes *cycH* y *cycJ* solos.

Como se ha mencionado la mutante IFC01 de *R. etli* muestra ausencia de citocromos c y aa<sub>3</sub>. De hecho, solamente el citocromo tipo b parece no haberse afectado. En espectros diferenciales de reducido menos oxidado (ditionita-persulfato de amonio) la cepa mutante IFC01 mostró la ausencia de todos los citocromos tipo c y aa<sub>3</sub> (García, 1992). Como se observa en la Fig 7 al complementar con el fragmento de 2.8 kb (pML60) restauramos el fenotipo como el de la cepa silvestre CE3.

La ausencia de citocromos tipo c pudo ser verificada por tinción del grupo hemo en proteínas membranales esto al separarlas, mediante geles de poliacrilamida. El cual reveló la presencia del grupo hemo unido covalentemente, esta técnica se hizo siguiendo la recomendaciones de (Vargas, 1993). Como se observa en la Fig 3 la cepa IFC01 complementada con el plásmido pML60 fue capaz de expresar los citocromos c a los niveles de la cepa silvestre CE3.

El análisis de la mutante CFN4202, la cual al igual que la cepa IFC01 está afectada en el gene *cycH*, mediante la separación de proteínas en geles de poliacrilamida, en experimentos de Western Blot reveló la presencia de apoproteínas tipo c así como también de los c<sub>1</sub>(Soberón et al 1993) lo cual nos da argumentos para suponer que la alteración es en el pegado covalente del hemo a la apoproteína, Estos datos son indicativos de que las mutantes IFC01 y CFN4202 se encuentran afectadas en la

biogenesis probablemente a nivel de la hemoliasa .

Es importante mencionar que la cepa IFC01 y la cepa CFN4202 fueron capaces de expresar citocromos tipo c y aa3 en ciertas condiciones de cultivo; es decir, al hacer espectros diferenciales de ( ditionita-reducido menos persulfato-oxidado) con doce horas de crecimiento, usando como medio de cultivo PY. Estos datos sugieren que puede existir una hemoliasa alternativa en *R. etli*. (Garcia,1992)

Nosotros presentamos evidencia de que el gene *cycJ* esta reiterado, asimismo, no detectamos alguna reiteración del gene *cycH*. Sin embargo, no tenemos más elementos por el momento de que este gene *cycJ* este involucrado en la biogénesis de citocromos tipo c en cultivos exponenciales, esto queda para experimentos futuros. El hecho de que nosotros no detectamos alguna reiteración del gene *cycH*, puede deberse, quizás a que el gene caracterizado en este trabajo no muestre similitud con aquel, o bien que exista una hemoliasa alternativa o diferente que no requiera el producto codificado por el gene *cycH*.

Nosotros reportamos la identificación de tres marcos de lectura abiertos, el primero de 1031 nucleótidos, 344 aminoácidos (aa). Debido a problemas de estructuras secundarias no se pudo determinar con exactitud la secuencia nucleotídica de la región que correspondería a los primeros 20 aa de las otras proteínas Cych. Alineamientos de Cych de *R. etli* contra el Cych de *R. meliloti* muestran una zona de alta similitud en el aa No. 1 de nuestra secuencia con el aa 20 de la secuencia de Cych de *R. meliloti*. En todas las proteínas Cych hasta ahora reportadas (*B.japonicum*, *R. meliloti*, *Paracoccus denitrificans*) existe una región hidrofóbica de alrededor de 20 aa en el extremo amino terminal de las proteínas Cych.

Sin embargo del ORF encontrado en este trabajo muestra una alta similitud de 59 % entre este ORF y los diferentes *cycH*'s. Es necesario continuar la secuencia del gene *cycH* de *R. etli* hacia el extremo 5', con el propósito de identificar el inicio de la traducción y estudiar si esta proteína también se encuentra una región hidrofóbica similar a los reportadas para los otros *cycH*'s.

El análisis de hidrofobicidad de las proteínas Cych de *R. meliloti* y *B. japonicum* demuestran una segunda región hidrofóbica de 15 a 20 aa, aproximadamente a partir del aa 70. Estos datos sugieren que el gene *cycH* de *R. etli* al, igual que los otros genes *cycH* pudiera estar anclado a la membrana y viendo hacia el periplasma, Fig 4 C.

Para concluir, se ha propuesto que Cych es una proteína que reconoce e interacciona directamente con los diferentes citocromos tipo c. En base a esto se puede sugerir que la función de esta proteína es darle especificidad y capacidad de reconocimiento de los diferentes citocromos tipo c a la enzima hemoliasa. (Ferguson and Page 1994).

Por último creo que este tipo de investigación nos permitió conocer un poco más acerca de la estrecha relación entre la fijación de nitrógeno y la respiración porque como observamos a lo largo de este trabajo la cadena respiratoria es vital para un buen establecimiento simbiótico.

## MATERIAL Y METODOS

### CEPAS BACTERIANAS

*Rhizobium etli* IFC01 (caracterizada bioquímicamente en el laboratorio del Dr. Edgardo Escamilla del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM). Todas las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo a continuación se describen.

#### *Rhizobium etli*

|              |   |                      |
|--------------|---|----------------------|
| CFN42        | Cepa silvestre  | Quinto, et al, 1984. |
| CE3          | derivada de la CFN42, Smr   | Noel, et al, 1984    |
| IFC01        | Mutante aislada después de la transferencia del Tn5 a la cepa CE3.                      | García,1990.         |
| CFN4202      | Mutante aislada después de insertarle un Mu-dI a la cepa CE3.                           | Soberón, et al, 1993 |
| DH5 $\alpha$ | $\alpha$ complementacion de <i>lacZ</i> Genotipo F-, <i>deoR</i> , <i>recA1 endA1</i> . | GibcoBRL             |
| DH11S        | $\alpha$ complementacion de <i>lacZ</i> Genotipo F', <i>recA1398</i> ,                  | GibcoBRL             |

#### PLASMIDOS Y VECTORES

|       |  |
|-------|--|
| pGMS3 | plásmido que contiene el fragmento <i>EcoR1</i> que contiene el Tn5- <i>mob</i> de 10.3 clonado en pSK (gene <i>cycH</i> ) |
|-------|--|

|           |  |                   |
|-----------|--|-------------------|
| pSK o pKS | Vector de clonación<br>polilinker de 21 sitios unicos<br>Bluescript, Cole1,f1, promotor<br>lacZ, Amp r. (Stratagene) |                   |
| pRK7813   | Derivado del RK2, polilinker<br>obtenido del puc9, oriT, Tra+,<br>Incl, ColE1 Tcr.                                   | Jones, et al 1987 |

## MEDIOS DE CULTIVO

Para el crecimiento de *R. etli* fue utilizado el medio PY (Peptone-Yeast), que consiste de peptona de caseína al 0.5%, extracto de levadura al 0.3%, y  $\text{CaCl}_2$  10mM. También se usó medio mínimo (MM) para este medio se prepararon soluciones stock de 100ml para cada sal,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.2g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5.35g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.2g;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.055g; (esta es la excepción aquí solo se preparó 25 ml de soluciones stock), y como fuente de carbono, Succinato de sodio pH 6.8, 13.5g. De estas soluciones. agregar 1ml por cada 100ml de medio, excepto para el hierro que se adiciona 0.5ml y para medio sólidos se agregan 1.5% de agar para ambos medios. Como temperatura de incubación 30C.

Otro medio de cultivo que se utilizó en el crecimiento de *Rhizobium*, YS (Yeast- Succinato) y este contenía  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.75g, fosfato de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.75g,  $\text{MgSO}_4$ ; 0.30g,  $\text{NaCl}$ ; 0.20g, extracto de levadura 0.75g, Succinato de sodio pH 6.8, 13.5 g de esta solución agregar 1mL por cada 100 mL de medio.  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.06g. Todo para aforar a 1.5 L con agua.

Para *E. coli*, el medio que se utilizó fue LB (Luria-Bertani), es Triptona, 1%, extracto de levadura 0.5%,  $\text{NaCl}$  0.5% pH 7.2. La temperatura del cultivo fue 37°C.

La concentración (en microgramos por mililitro) usada de los antibióticos empleados fueron los siguientes; ampicilina (100), kanamicina (30) ácido nalidíxico (20) y tetraciclina (10).

## AISLAMIENTO DE DNA PLASMIDICO

Los plásmidos fueron purificados por el método de lisis alcalina, (Maniatis, 1982). Para su análisis fueron digeridos con la enzima

necesaria, y los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer Tris Acetato pH 8.0.

## CLONACIONES Y TRANSFORMACIONES

Las clonaciones fueron llevadas a cabo en vectores bluescript pSK o pSK (Stratagene) y en las cepas DH5alfa y DH12s las transformaciones, mapas de restricción aislamiento de plásmido fueron hechas según los protocolos referencia (Manniat,1972).

Para el gene mutado se utilizó la siguiente estrategia El DNA total de la cepa IFC01 así como el vector pSK fueron digeridos con la enzima EcoRI. Una vez digeridos, ambos fueron ligados, durante toda la noche a 16°C. La clona se buscó cuando la ligación fue plaqueada en ampicilina y kanamicina, se hizo en estos antibióticos debido a que el vector pSK presenta resistencia a ampicilina y el fragmento mutado tenía resistencia a kanamicina. El plásmido pSK contiene el gene *lac-Z*, con lo cual nos permite seleccionar clonaciones en el polilinker por la interrupción de este gene.

## AISLAMIENTO DE DNA TOTAL

El aislamiento del DNA de *R.etli* se realizó a partir de cultivos crecidos por 24 hr a 30°C. Las células se colectaron por centrifugación y fueron resuspendidas en buffer TE 50-20 (Tris- HCl 50mM-EDTA 20mM) pH 8.0. La lisis se llevó a cabo por la adición de 0.5ml de SDS al 10% en TE 50-20 y 0.5mM de pronasa (2mg/ml en TE, predigerida 1 Hr a 37° C). La incubación de lisis fue d 1 hr a 37° C. Se redujo la viscosidad pasando de 3 a 5 veces por una jeringa; agregando un volumen de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (24-24-1) se realizaron extracciones de una a tres veces recuperando la fase acuosa. Después se hizo la extracción 2 veces empleando unicamente cloroformo, a la fase se le agregó de NaCl 0.25M (Concentración final), 2 volúmenes de etanol al 100% y se incubo a -20°C,toda la noche. Se recuperó el DNA precipitado centrifugando 20 minutos a una velocidad 10 000 rpm a 4°C y resuspendiendo la pastilla en 0.5ml de H<sub>2</sub>O estéril.

## HIBRIDIZACION TIPO SOUTHERN

Esta técnica fue descrita por Southern (1975 ). El DNA fue digerido con las enzimas de restricción necesarias, separando por electroforesis en

un gel de agarosa al 1% y transferido alcalinamente (0.4M NaOH) a una membrana de Nylon (Hybond-N+). Las sondas fueron marcadas con  $^{32}\text{P}$ , por medio de "random primer", utilizando un "Kit" de marcaje New England Nuclear (Dupont).

Posteriormente las membranas fueron pre e hibridadas (Rapid-hyb buffer; Amersham) por 6-8 horas y expuestas a la sonda correspondiente ya marcada, durante 8-12 horas. Las condiciones de hibridización fueron : a  $42^{\circ}\text{C}$  toda la noche; y las condiciones de lavado fueron, 15min ( $42^{\circ}\text{C}$ ) 2xSSC, 15min ( $65^{\circ}\text{C}$ ) 2xSSC, 30 min ( $65^{\circ}\text{C}$ ) 1xSSC, 0.1% SDS. Las enzimas de restricción se utilizaron de Boehringer Mannheim GmbI, BRL. (Según especificación del proveedor).

## SECUENCIA.

La estrategia para secuenciar se hizo digiriendo el fragmento *EcoRI*, (pGMS3) mutagenizado de aproximadamente 2.8 kb, este fragmento fue clonado en pSK. La secuencia fue determinada usando el método de terminación de cadena de dideoxinucleótido (Sanger et al 1977). Para poder hacer este análisis el fragmento mutagenizado se digirió con diferentes enzimas de restricción según fue el caso una vez obtenido este mapa se subclonaron dos fragmentos hacia afuera del Tn5, denominadas pML15 y pML25 , además de dos subclonas pML25X/B y pML25B/E, se usaron oligonucleótidos comerciales y sintéticos así como el uso de cadena sencilla. La estrategia de secuencia fue hecha como se observa en la Fig 4A.

El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida se hizo con los programas Blast y Gene Works versión 2.4. En la Fig 4B se observa los alinamientos del gene *cycH* de *R. etli* con otros *cycH* de diferentes especies bacterianas.

## DETERMINACION DE FIJACION DE NITROGENO

Para las pruebas de reducción de acetileno se utilizó frijol negro jamapa esterilizado superficialmente en hipoclorito y las semillas fueron puestas en papel filtro estéril y húmedo. Tres días después, las semillas fueron transferidas a macetas de plástico con vermiculita (soporte sintético). Se inoculó con una suspensión de bacterias de las cepas CE3, IFC01 IFC01/pML60, IFC01/pML394, CFN4202, CFN4202/pML60, CFN4202/pML394 (Tabla 1) medio PY sin adición de nitrógeno y se crecieron en invernadero. Después de 21 días de inoculación, la nodulación

| Cepas   | Características generales |                    |                  | Complementación Fenotipo TMPD en MM |                                |
|---------|---------------------------|--------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| CE3     | Fix <sup>+</sup>          | Inf <sup>+</sup>   | Nod <sup>+</sup> |                                     |                                |
| IFCO1   | Fix <sup>-</sup>          | Inf <sup>+/-</sup> | Nod <sup>+</sup> | Cósmido<br>pML394 <sup>+</sup>      | Plásmido<br>pML60 <sup>+</sup> |
| CFN4202 | Fix <sup>-</sup>          | Inf <sup>-</sup>   | Nod <sup>+</sup> | Cósmido<br>pML394 <sup>+</sup>      | Plásmido<br>pML60 <sup>-</sup> |

TABLA 1 . Características generales y complementación del fenotipo TMPD en medio mínimo (MM) de las cepas utilizadas.

fue cuantificada. Así mismo, la actividad de la nitrogenasa fue determinada por medio de la reducción de acetileno de las raíces de las plantas noduladas, estas raíces fueron transferidas a frascos con sellos de goma inyectando acetileno a una concentración final de 10% de este gas, esta determinación se hizo en un cromatógrafo de gases Varian modelo 3300. Y la determinación fue hecha según (Bergensen,1980).

## PRUEBAS DE COMPLEMENTACION.

Para las pruebas de complementación se hicieron cruza triparentales de las cepas mutantes IFC01 y CFN4202 vs los plásmidos pML60, pML394. En todas las cruza se uso la cepa ayudadora pRK2013 todas crecidas en PY, una vez crecidas por 72 horas se tomaron colonias aisladas y se parcharon en medio mínimo(MM), se dejaron crecer también durante 72 horas, y aquellas colonias que recuperaron el fenotipo TMPD+(N-N-N'-Tetra metil-*p* phenylendiamina ) es decir, el mismo fenotipo que la cepa silvestre, virando de leucas a azules,eran la transconjugantes con el fenotipo recuperado, esto se observa en aproximadamente 30 segundos (MacFaddin, 1980) no obstante para confirmar el fenotipo se inocularon plantas como se mencionó anteriormente.

## CLONACIONES Y TRANSFORMACIONES.

Las clonaciones fueron llevadas a cabo en vectores bluescript (Stratagene) y en las cepas DH5alfa y DH11s las transformaciones, mapas de restricción, aislamiento de plásmido fueron hechas según los protocolos referencia (Manniatis,1972).

## ELECTROFORESIS SEMIDESNATURALIZANTE

Con el fin de visualizar la presencia de citocromos tipo c se hizo electroforesis semidesnaturalizante tipo Laemli (1970) con la excepción de que las muestras no se sujetan al tratamiento con calor además, de la ausencia de SDS en el buffer de la muestra. En cada carril se cargó 300 microgramos de proteína. Para detectar el grupo en se llevó a cabo en propio gel, agregando 4ml del detector (luminol) (ECL Western blotting protocols detection reagents RPN2109 Amersham), por 4 minutos, quitando el exceso del detector. Después de transcurrido este tiempo, el gel se envuelve en una película de plástico autoadherente, el gel expone directamente con una placa autoradiografica, toda la noche, y se revela al otro día. Las placas autoradiograficas son Hyperfilm-ECL, Amersham.

## BIBLIOGRAFIA

Anraku, Y. and R.B. Gennis, 1987. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 12: 262-266

Anraku, Y., 1988. Bacterial electron transport chains. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 101-132

Appleby, C.A., 1969. Electron transport systems of *Rhizobium japonicum* II. *Rhizobium* haemoproteins cytochromes and oxidases in free living (culture cell) *Biochim. Biophys. Acta.* 172: 88-105

Appleby, C.A., 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35: 443-478

Avissar, Y.J., and Nadler D. 1978. Stimulation of tetrapyrrole formation in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 135: 782-789

Banfalvi, Z., Sakanyan V, Konez C, Kiss A, Dusha I, Kondorosi A. 1981. Localization of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184: 318-325

Barquera, B., Garcia-Horsman, A., and Escamilla J.E. 1991. Cytochrome *d* expression and regulation pattern free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 21: 1-6

Bardwell, J.C.A., McGovern, K. and Beckwith, J. 1991 *Cell* 67, 581-589. Tomado de Beckman, D.L., and Kranz, R. 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2179-2183

Beckman, D.L., Trawick, D.R. and Kranz, R.G. 1992 Bacterial cytochromes *c* biogenesis. *Genes Dev.* 6: 268-283 Tomado de Beckman, D.L., and Kranz, R. 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2179-2183

Beckman, D.L., and Kranz, R. 1993 Cytochromes *c* biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2179-2183

Berg, D., Weiss, A., and Crossland L. 1980 Polarity of Tn5 insertion Mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 439-446

Bergensen, F.J., and Turner, G.L. 1980 Properties of terminal oxidase systems of bacteroids from root nodules of soybean and cowpea and of  $N_2$  bacteria grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol* 118: 235-252

Bott, M., Bolliger, M., Hennecke, H. 1990. Genetic analysis of the cytochrome *c-aa<sub>3</sub>* branch of the *Bradyrhizobium japonicum* respiratory chain. *Molecular microbiol.* 4: 2147-2157

Bott, M., Ritz, D., and Hennecke, H. 1991. The *Bradyrhizobium japonicum* *cycM* gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome *c*. *J. Bacteriol.* 173, 6766-6772

**Bott, M., Ritz, D., Hennecke, H. 1992.** Genes for a second terminal oxidase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* **158:** 335-343

**Dumont, M.E., Hampsey, D.M. and Sherman, F. 1987.** Identification and sequence of the gene encoding cytochrome c heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **6:** 235-241

**Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E., Buikema, W.J., and Ausubel F.M. 1982.** Construction of broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants *Gene* **18:** 289-296

**Gallon, J.R. 1992.** Reconciling the incompatible : N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. Review N0 44. *New Phytologist*

**Garcia, E. 1992.** Papel del citocromo aa<sub>3</sub> en la fijación simbiótica de nitrógeno análisis de un mutante aa<sub>3</sub> de *Rhizobium phaseoli*. Tesis de licenciatura UNAM

**Haddock, B.A., and Jones, C.W., 1977** *Bacterial Rev.* **41:** 47-99

**Hill, S. 1988** How is nitrogenase regulated by oxygen?. *FEMS Microbiol. Rev.* **34:** 11-130

**Jones Jonathan D.G. and Guttererson Neal 1987** AN efficient mobilizable cosmid vector, pRK7813, and its use in a rapid method for marker exchange in *Pseudomonas fluorescens*. *GENE*, **61:** 299-306

**Jones, C.W. 1988.** Membrane-associated energy conservation in bacteria: an general introduction. En: Antony, C. (ed). *Bacterial energy transduction*. Academic Press, London, pp. 1-82.

**Kahn, D., Batut, M.L., Daverson, and Fourment. 1993.** Structure and regulation of the *fixNOQP* operon from *Rhizobium meliloti*, p.47. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios, R., Mora, J., and Newton, W. (ed) Kluwer academic Publishers, The Netherlands.

**Kelly, M.J.S., Poole, R.K., Yates, M.G. and Kennedy, C. 1990** Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome *bd* terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome *d* complex are unable to fix nitrogen in air. *J. Bacteriol* **172:** 6010-6019

**Kestier, D.I., and March, S.S. 1990** Hemoproteins of *Bradyrhizobium japonicum* cultured cells and bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* **56:** 2736-2741

**Kondorosi, E. and Kondorosi, A., 1986.** Nodule induction on plants roots by *Rhizobium*. *Trends Biochem. Sci* **11:** 296-299

**Kyte, J. and Doolittle, R.F. 1982.** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157:** 105-132

**Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook. 1982** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

**Mandon, K., Kaminski, P.A. and Elmerich, C. 1994** Functional analysis of *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*, *J. Bacteriol.* **176 (9): 2560-2568.**

**Macfaddin, J.F. 1980** Biochemical test for identification of medical bacteria. Baltimore: Williams and Wilkins.

**Morrison, N., and Verma, D.P.S. 1987** A block in the endocytosis of *Rhizobium* allows cellular differentiation in nodules but affects the expression of some peribacteroid membrane nodulins. *Plant Mol. Biol.* **9: 185-196.**

**Nargang, F.E. Drygas, M.E. Kwong, P.L., Nicholson, D.W., and Neupert, W. 1988** A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome c heme lyase activity cannot import cytochrome c into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **264: 9388-9394**

**Newton, W.E., 1993** Nitrogenase: Distribution, composition, structure and function. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios, R., Mora, J., and Newton, W. (ed) Kluwer academic Publishers, The Netherlands.

**Noel, D., 1993** *Rhizobium leguminosarum* CE3 lipopolysaccharide structure required in symbiosis with bean. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Palacios, R., Mora, J., and Newton, W. (ed) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.

**O'Brian, M.R., Kirshbom, P.M. and Maier, R.J. 1987** Tn5-induced cytochrome mutants of *Bradyrhizobium japonicum*: effects of the mutations on cells grown symbiotically and in culture. *J. Bacteriol.* **169: 422-430**

**O'Brian, M.R., and Maier, R.J., 1989** Molecular aspects of the energetics of nitrogen fixation in *Rhizobium-legume* symbiosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **974: 229-246.**

**Page, D. and Ferguson, S.J. 1994** cloning and sequence analysis of gene from *Paracoccus denitrificans*: The *cycH* gene product is required for assembly of all *c*-type cytochromes including cytochrome *c1*. No publicado tomado del GenBank No de acceso Z36942

**Pearson, W.R., and Lipman, D. J. 1988** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85: 2444-2448.**  
**Tomado de Beckman, D.L., and Kranz, R. 1993** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90: 2179-2183**

**Peek, J.A. and Taylor, R.K. 1992** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89: 6210-6214** **Tomado de Beckman, D.L., and Kranz, R. 1993** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90: 2179-2183**

**Preisig, O., Anthamatten, D., and Hennecke, H. 1993** Genes for microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90: 3309-3313**

**Ramseier, T.M., Winteler, H.V. and Hennecke, H. 1991** Discovery and sequence analysis of bacterial genes involved in the biogenesis of *c*-type cytochrome. *J. Biol. Chem.* **266, 7793-7803**

**Rees, D.C. Kim, J., Georgiadis, M., Chan, M.K., Komiyama, H., Woo, D., Chirino, A.J., Schlessman, J., and Hsu, B.T., 1993** Structure and functions of the nitrogenase proteins. *New*

**Horizons in Nitrogen Fixation.**Palacios,R.,Mora,J., and Newton,W.(ed) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.

**Rippka,R., Deruelles, J., Waterbury,J.B.,Herdman,Mand Stanier,R. 1979** Generic assignments, strain histories and propieties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol. 111: 1-61**

**Sanger,F. and Coulson,A.R. 1978** The use of thin acrylamide gel for DNA sequencing. **FEBS Lett. 87: 107-110**

**Schluter,A., Patschkowski,T., Weidner,S., Uden,G.,Hynes,M.F.,and Priefer,U.B. 1993** Funtionaland regulatory characteristics of FnrN, an oxygen-reponsive transcriptional activator in *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae; **New Horizons in Nitrogen Fixation.**Palacios,R.,Mora,J., and Newton,W.(ed) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.p.493

**Soberón,M., Williams, H.D., Poole R.K., and Escamilla E. 1989.** Isolation of RHizobium phaseoli cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. **J. Bacteriol. 171: 465-472**

**Soberón,M., Membrillo-Hernandez,J., Aguilar,G.,Sanchez, F.1990** Isolation of Rhizobium phaseoli Tn5- induced Mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases  $\alpha$  and  $\alpha\alpha 3$  **J. Bacteriol. 172: 1676-1680**

**Soberón,M.,Aguilar,G.,and Sanchez F. 1993** *Rhizobium phaseoli* cytochrome *c* deficient mutant induced empty nodules on *Phaseolus vulgaris* L **Mol. Microbiol. 8: 159-166**

**Ritz,D.,Bott,M.,and Hennecke.H. 1993** Formation of several bacterial *c*-type cytochromes requires a novel membrane -anchored protein that faces the periplasm. **Mol. Microbiol. 9(4): 720-740.**

**Roserberg,C. Boisterd,P, Denarie,J. Casse-Delbart, F. 1981** Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. **Mol Gen Genet. 184: 433-439**

**Thony-Meyer,L.,Stax,D. and Hennecke,H. 1989** An unusual gene cluster for the cytochrome  $bc_1$  complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirements for effective root nodule symbiosis. **Cell 57: 683-697**

**Thony-Meyer,L Ritz,D., and Hennecke,H. 1994** Cytochrome *c* biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. **Mol. Microbiol. 12: 1-9**

**Witty,J.F. and Minchin,F.R.,1990** Oxigen diffusion in the legume root nodule In Nitrogen Fixation : Achievements and objetives (ed) Gresshoff,L.E. Roth, G,Stacey and Newton W.E. Champan and Hall New York, USA.

**Wittenberg,J.B., Bergensen,F.J. Appleby, C.A., 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**

**Horizons in Nitrogen Fixation.**Palacios,R.,Mora,J., and Newton,W.(ed) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.

**Rippka,R., Deruelles, J., Waterbury,J.B.,Herdman,Mand Stanier,R. 1979** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol. 111: 1-61**

**Sanger,F. and Coulson,A.R. 1978** The use of thin acrylamide gel for DNA sequencing. **FEBS Lett. 87: 107-110**

**Schluter,A., Patschkowski,T., Weidner,S., Unden,G.,Hynes,M.F.,and Priefer,U.B. 1993** Functional and regulatory characteristics of FnrN, an oxygen-responsive transcriptional activator in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; **New Horizons in Nitrogen Fixation.**Palacios,R.,Mora,J., and Newton,W.(ed) Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.p.493

**Soberón,M., Williams, H.D., Poole R.K., and Escamilla E. 1989.** Isolation of *Rhizobium phaseoli* cytochrome mutant with enhanced respiration and symbiotic nitrogen fixation. **J. Bacteriol. 171: 465-472**

**Soberón,M., Membrillo-Hernandez,J., Aguilar,G.,Sanchez, F.1990** Isolation of *Rhizobium phaseoli* Tn5- induced Mutants with altered expression of cytochrome terminal oxidases *o* and *aa3* **J. Bacteriol. 172: 1676-1680**

**Soberón,M.,Aguilar,G.,and Sanchez F. 1993** *Rhizobium phaseoli* cytochrome *c* deficient mutant induced empty nodules on *Phaseolus vulgaris* L **Mol. Microbiol. 8: 159-166**

**Ritz,D.,Bott,M.,and Hennecke.H. 1993** Formation of several bacterial *c*-type cytochromes requires a novel membrane -anchored protein that faces the periplasm. **Mol. Microbiol. 9(4): 720-740.**

**Roserberg,C. Boisterd,P, Denarie,J. Casse-Delbart, F. 1981** Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. **Mol Gen Genet. 184: 433-439**

**Thony-Meyer,L.,Stax,D. and Hennecke,H. 1989** An unusual gene cluster for the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex in *Bradyrhizobium japonicum* and its requirements for effective root nodule symbiosis. **Cell 57: 683-697**

**Thony-Meyer,L Ritz,D., and Hennecke,H. 1994** Cytochrome *c* biogenesis in bacteria: a possible pathway begins to emerge. **Mol. Microbiol. 12: 1-9**

**Witty,J.F. and Minchin,F.R.,1990** Oxygen diffusion in the legume root nodule In **Nitrogen Fixation : Achievements and objectives** (ed) Gresshoff,L.E. Roth, G,Stacey and Newton W.E. Chapman and Hall New York, USA.

**Wittenberg,J.B., Bergensen,F.J. Appleby, C.A.. 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**

**Vargas, C., McEwan, A.G. and Downie J.A. 1993. Detection of c-type cytochrome using enhanced chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 209:323-326**