

13
03062 2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de
Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades
Centro de Investigación sobre fijación de Nitrógeno



ESTRUCTURA Y EVOLUCION DEL GENOMA SIMBIOTICO
DE Rhizobium phaseoli

T E S I S **TESIS CON FALLA DE ORIGEN**
Que para optar por el Grado de
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
p r e s e n t a
OSCAR RODRIGUEZ SANCHEZ

Cuernavaca, Mor.

Octubre 1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

ESTRUCTURA Y EVOLUCION DEL GENOMA SIMBIOTICO DE Rhizobium phaseoli

INTRODUCCION -----	1-13
I.1 De una taxonomía fenotípica a una taxonomía genotípica	1-3
I.2 Filogenia Bacteriana -----	3-5
I.3 Especie Bacteriana -----	5-7
I.4 Taxonomía en <u>Rhizobium</u> -----	7-8
I.5 <u>Rhizobium phaseoli</u> -----	9-13
OBJETIVO -----	14
MATERIALES Y METODO -----	15-25
RESULTADOS Y DISCUSION -----	26-45
1. Análisis de <u>R. phaseoli</u> , de aislados naturales del suelo de Tepoztlán, Mor. -----	26-32
2. Análisis de la similitud entre cepas aisladas de Tepoztlán, a través de las secuencias del plásmido simbiótico. -----	32-36
3. Análisis filogenético entre cepas aisladas de Tepoztlán y otros tipos de <u>Rhizobium</u> a través de las secuencias del plásmido simbiótico. -----	36-44
4. Análisis del agrupamiento de cepas aisladas de Tepoztlán y de <u>R. phaseoli</u> de distinto origen geográfico a través de cósmidos con secuencias exclusivas del cromosoma de la cepa CFN42. -----	44-45
CONCLUSIONES -----	46
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS -----	47-50
FIGURAS -----	21 Figuras
TABLAS -----	2 Tablas

**ESTRUCTURA Y EVOLUCION DEL GENOMA SIMBIOTICO DE Rhizobium
phaseoli**

I. INTRODUCCION

I.1 - De una taxonomía fenotípica a una taxonomía genotípica.

El estudio de la historia biológica de las especies (FILOGENIA) así como el de la variabilidad genética dentro de la especie (GENETICA DE POBLACIONES), proveen en la actualidad, dos enfoques experimentales fundamentales para comprender cuándo y cómo evolucionan los organismos.

Inicialmente, los organismos fueron agrupados en especies tomando como parámetros fundamentales las estructuras que poseen y su aspecto físico (Taxonomía morfológica). Este sistema permitió organizar la diversidad biológica en diferentes reinos y se propuso a los seres vivos más sencillos como antecesoros de los más complejos. Además, a través de la Paleontología, la Anatomía comparada y la Fisiología comparada también se propuso un tiempo para su aparición; es decir, la diversidad es el resultado de cambios en especies sencillas que al ser seleccionadas a lo largo del tiempo, generaron especies más complejas.

Bajo estos criterios, las células procariotes (como las bacterias) tienden a parecerse más entre sí y, por lo

tanto, se dificulta hacer una taxonomía de ellas.

A partir del descubrimiento del DNA como molécula portadora de la información genética, los biólogos moleculares propusieron estudiar la evolución con base en las similitudes o diferencias entre fragmentos de DNA de distintos organismos, pero que codifican para funciones equivalentes.

Dado que en el DNA se encuentran impresos los distintos genes (genotipo) y que dan las características propias del organismo (fenotipo), entonces, se pueden comparar entre dos organismos dados las secuencias, ya sean, nucleotídicas de un gene o de aminoácidos para una proteína (Woese, C.R., 1992).

La ventaja más importante de esta contribución es que los nucleótidos y aminoácidos compartidos por los organismos a comparar, están restringidos en número y nos permiten generar términos de probabilidad de semejanza o diferencia, estableciendo por convención, nuevos parámetros más objetivos, en la definición de una especie. (Fox, et al., 1980). Sin embargo, el avance en los estudios genéticos moleculares indican, que si bien el obtener la secuencia de un gene es factible, obtener la secuencia completa de un genoma, ya no lo es tanto. (aún tomando en cuenta el avance tecnológico en el desarrollo de la metodología de secuenciación). Por otra parte, también ha sido propuesto que no todos los genes de un genoma reflejan fielmente las distancias entre dos especies. (Woese, C.R., 1987)

Para la solución de este tipo de problemas se han seleccionado algunos genes como cronómetros evolutivos. Estos

genes además de ser altamente conservados, reúnen las siguientes características:

- a) comportamiento de reloj, donde los cambios sean proporcionales al tiempo y donde cada cambio se distribuya azarosamente en la secuencia utilizada.
- b) rango de las velocidades de cambio que corresponda al espectro de las distancias evolutivas que se quieren determinar. Es decir, debe haber zonas de la secuencia con relativa constancia y zonas más variables (algo así como las manecillas de horas, minutos y segundos de un reloj).
- c) tamaño del gene lo suficientemente grande como para proveer la información necesaria.

Los genes más utilizados para este propósito han sido el citocromo C y los genes que codifican para el RNA ribosomal 16S. Con el uso de estos genes, se construyen los árboles filogenéticos modernos. (Woese, C.R., 1992) (Ver Fig. 1)

I.2 -Filogenia Bacteriana

El caso del estudio evolutivo de las bacterias es, sin duda, un campo que se vio altamente beneficiado al cambiar los parámetros fenotípicos por los genotípicos, ya que morfológicamente las bacterias son muy parecidas.

Debido al lugar que ocupan estos microorganismos en la

escala evolutiva, la importancia de conocer su filogenia va a incidir en varios conceptos, tales como: la naturaleza del ancestro universal (origen de la vida), el origen de las células eucariotes, e inclusive sobre nuestros conceptos de selección y evolución.

En la filogenia propuesta por Haeckel en 1896, los organismos se agruparon en plantas, animales y microorganismos. Para 1930 E. Chatton construyó una filogenia universal en la cual separó a los seres vivos en dos grandes grupos: procariotes y eucariotes (tomado de la tesis doctoral de Segovia, L.). Más recientemente, Whittaker, R.H. y Margulis, L.(1978) propusieron la organización de los seres vivos en cinco reinos: Animal, Vegetal, Hongos, Protista y Monera. Sin embargo las bacterias a diferencia de otros organismos, son capaces de transferir la información genética hereditaria tanto en forma vertical (al reproducirse vegetativamente) como en forma horizontal (al participar en procesos sexuales). Esta capacidad de transferencia horizontal permite la adquisición inmediata de nuevas funciones, es decir, la posibilidad de que una función que haya evolucionado en un organismo sea transferida a otro mediante conjugación, transducción o inclusive transformación genética.

Estas observaciones podrían indicar que las bacterias participan de una poza común de genes y que difícilmente pueden ser agrupadas por filogenias (Hedges, 1972). En este sentido, se ha propuesto el término de geno especie para todas aquellas bacterias que pueden intercambiar material genético (). Sin embargo, cuando estas bacterias fueron analizadas comparativamente

para las secuencias de sus RNA 16S ribosomales, se pudo obtener una filogenia.

Con base en el análisis realizado sobre la secuencia del gene 16S ribosomal, se ha establecido también una nueva filogenia de los organismos. En esta filogenia los organismos se agrupan en tres dominios que muestran una separación clara donde todos los miembros de un dominio se parecen más entre sí que a los de cualquier otro dominio. Actualmente, se proponen los siguientes grupos para el dominio Bacteria: Termotogales, Flavobacterias, Cianobacterias y Bacterias púrpuras (con cuatro divisiones: alfa, beta, gama y delta), Bacterias Gram Positivas y Bacterias verdes no sulfurosas. Los grupos propuestos provienen del análisis del RNA ribosomal 16S de más de 500 especies bacterianas. En este análisis, la mayoría de los grupos mantuvo características fenotípicas comunes. Las inconsistencias probablemente se deben a que las características fenotípicas seleccionadas no reflejan las características genéticas (Woese, C.R., 1992), o a que el análisis de esa secuencia específica no representa fielmente a la filogenia del resto del genoma de la bacteria.

1.3 - Especie bacteriana

El concepto de especie de Mayr (propuesto en 1982), define una especie como: "una comunidad reproductivamente aislada de otras poblaciones que ocupa un nicho específico en la naturaleza".

Desde este punto de vista, las bacterias no cumplen este requisito, ya que esencialmente su reproducción es asexual y son capaces de una transferencia genética horizontal que no reconoce las barreras propuestas para las especies.

En los estudios de genética de poblaciones utilizando los ensayos de electrofenotipos de isozimas, se ha encontrado que la variabilidad genética es mayor en bacterias que en eucariotes. El 90% de los loci son variables en bacterias, mientras que sólo el 30%, lo son en eucariotes. Además, el promedio de alelos por locus es tres veces mayor en bacterias que en eucariotes (Young, P.W., 1992). Se ha observado también, que las diferencias geográficas contribuyen muy poco en la diversidad total de la especie y que además, el problema de la transferencia horizontal, implica la posible existencia de tipos intermedios entre especies.

Al estudiar cepas de E. coli y S. typhimurium, se observó que todos los aislados de E. coli se parecen mucho más entre ellos que a cualquier Salmonella, tanto por criterios de hibridización de DNA total, como por criterios fenotípicos. Cuando se transfiere DNA de E. coli a cepas de Salmonella, se observa que este DNA se integra en el cromosoma a menor frecuencia que el DNA proveniente de transferencias intraespecíficas.

Estas observaciones nos indican que el concepto de especie que se utiliza en organismos eucariotes tiene severas limitaciones al tratar de aplicarlas a bacterias. En 1984, Jhonson, propuso que todas las bacterias cuyos DNA's mostraran un 60% o más de homología se deberían clasificar dentro de la

misma especie. Sin embargo, cuando se aplican estos criterios a bacterias capaces de asociarse con plantas, tanto en el caso de asociaciones patógenas (*Pseudomonas*), como en el caso de asociaciones simbióticas (*Rhizobium*), forman grupos claros donde el nivel de homología de DNA puede ser sólo del 30 al 40%

De acuerdo a las observaciones anteriores, se puede decir que la definición del concepto de especie en bacterias, es un problema actual de investigación.

I.4 - Taxonomía en Rhizobium

Las bacterias que pertenecen al grupo de las Rhizobiaceas se caracterizan por su capacidad de interaccionar con plantas. Al igual que en otros grupos de bacterias, la clasificación de estas bacterias también se ha hecho por parámetros fenotípicos y con base en la especificidad por el hospedero (ver Fig. 2). En este tipo de relaciones biológicas entre especies tan distantes evolutivamente, hace probable que la filogenia de ambas se vea afectada por la presencia o ausencia de la otra. En este sentido, la simbiosis entre el Rhizobium y la planta, es un modelo adecuado para el estudio evolutivo en función de las relaciones interespecíficas y por tanto, incide directamente en un nivel ecológico más complejo.

Durante la simbiosis, las bacterias infectan las células corticales de la raíz y dan lugar a una estructura altamente diferenciada llamada nódulo. Este proceso es el resultado de la diferenciación tanto de las células vegetales

como de las bacterias que las infectan. Las bacterias en el nódulo llevan a cabo la fijación biológica del Nitrógeno atmosférico, reduciéndolo a amonio, el cual se exporta a las partes aéreas de la planta donde es asimilado. La planta a su vez suministra a las bacterias la energía que requieren, en forma de esqueletos de carbono provenientes de la fotosíntesis. (Segovia 1991, tesis de doctorado).

Dentro de este grupo de bacterias, Agrobacterium tiene la capacidad de formar tumores en la planta, mientras que Rhizobium y Bradyrhizobium y pueden establecer una simbiosis con las raíces de las leguminosas.

En Rhizobium, la mayor parte de los genes que controlan la nodulación, la especificidad del huésped y la fijación de Nitrógeno se encuentran localizados en un plásmido de alto peso molecular, llamado plásmido simbiótico (pSim). Estos plásmidos pueden ser transferidos a otras bacterias por conjugación modificando sus capacidades simbióticas. (Martínez, 1987) (Brom, 1988)

Estudios recientes de las filogenias obtenidas con secuencias del gene ribosomal 16S de cepas de Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium (ver Fig. 3) propuesta por Young, son muy distintas a la propuesta en 1984 por Jordan. Es decir, según este parámetro genotípico, las cepas de Rhizobium se agrupan con Agrobacterium, Rochalimaea quintana y Brucella abortus (estas dos últimas, son patógenas de animales) mientras que Bradyrhizobium y Azorhizobium se agrupan junto con Rhodobacter Sphaeroides y Methylobacterium.

I.5 -Rhizobium phaseoli

Actualmente, las cepas de Rhizobium que establecen una simbiosis con las raíces de Phaseolus vulgaris (frijol), han sido clasificadas como R. phaseoli.

Estas cepas han sido estudiadas ampliamente desde el punto de vista fisiológico y de genética molecular. En este caso, me referiré esencialmente al aspecto de genética molecular.

La estructura genética de las cepas de R. phaseoli se caracteriza por la presencia de diferentes plásmidos de alto peso molecular siendo uno de ellos, el llamado plásmido simbiótico.

Con el propósito de estudiar la estructura genómica de Rhizobium, se han seguido tres líneas de investigación, que incluyen el estudio del plásmido simbiótico, de otros plásmidos además del simbiótico y del cromosoma bacteriano. Estas investigaciones, también incluyen a otros tipos de Rhizobium como marco de referencia evolutivo.

Con el fin de conocer la estructura genética del pSim de R. phaseoli, fue necesario obtener su mapa físico. Este mapa físico se obtuvo al analizar fragmentos de DNA de pSim clonados en distintos cósmidos.

El pSim de la cepa CFN42 de R. phaseoli es una estructura circular de 390 kb, la cual se encuentra clonada integralmente en 16 cósmidos. (Girard, et al., 1991)

Al analizar el contenido genético de este plásmido, se

encontró que contiene al menos 11 familias de secuencias reiteradas de dos a tres elementos cada una.

Una de estas familias repetidas incluye dos operones nifHKD separados por 120 kb y un tercer gene nifH. También, se encontraron que algunas regiones del pSim están conservadas en otros replicones denominados pa (donde la conservación es muy extensa, y pb y pf donde la conservación se restringe a un solo fragmento), lo cual sugiere la posibilidad de coevolución para estos plásmidos. En los análisis de hibridización heteróloga con otros genes simbióticos, se demostró que las secuencias nodABC están separadas en dos regiones, cada una de las cuales contiene un elemento semejante a una "nod box", además de la presencia de dos copias de los genes nifA y nodD (Girard, et al., 1991).

Las secuencias internamente reiteradas del plásmido simbiótico de R. phaseoli han sido responsables de los rearrreglos genéticos observados (amplificaciones y deleciones). (Romero, et al., 1991)

Los rearrreglos genéticos en Rhizobium phaseoli han sido identificados en el plásmido simbiótico (pd), en los otros replicones pa, pb, pc, pe, pf, y en el cromosoma. Los rearrreglos genómicos a nivel de los plásmidos en cepas de Rhizobium, incluyen: amplificación, deleción, cointegración e inclusive pérdida de los plásmidos (Brom, et al., 1991, Romero et al., 1991, Martínez, et al., 1990).

En el genoma completo de R. phaseoli, se ha estimado que contiene alrededor de 700 elementos reiterados agrupados en

200 familias y también se ha encontrado que este fenómeno se presenta en cepas de Agrobacterium. (Flores et al., 1987).

Estos datos indican que tanto el cromosoma como los plásmidos de R. phaseoli son estructuras dinámicas y plásticas; esto puede ser importante para las capacidades intrínsecas de adaptación a las modificaciones del medio. Sin embargo, salvo para el caso de las deleciones donde el evento es irreversible, la amplificación y la cointegración son rearrreglos que permiten revertir al estado inicial, una vez que se suprime la presión ambiental que lo seleccionó.

La conclusión anterior, sugiere un elemento nuevo a considerar al tratar de hacer una filogenia en Rhizobium, ya que R. phaseoli es capaz de llevar a cabo la transferencia genética tanto en forma vertical como horizontal, además de intercambiar información genética entre sus plásmidos e inclusive con el cromosoma.

Tratando de establecer una filogenia en Rhizobium phaseoli a través de una taxonomía molecular, se analizaron los cromosomas de un grupo de cepas por análisis de electrofenotipos (Piñero, et al., 1988) y se obtuvo que existían dos tipos (I y II) de R. phaseoli (Martínez, et al., 1988). Actualmente, el segundo tipo ha sido propuesto como una nueva especie, Rhizobium tropici. (Martínez-Romero, E., 1991). Por otra parte se ha observado que existen cepas cuyo cromosoma es muy similar a Rhizobium, sin que estos sean capaces de nodular, debido a la ausencia del pSim (Jarvis, et al., 1989, Segovia, et al., 1991). Al analizar las cepas no-simbióticas y su relación con

cepas simbióticas tanto por electroforesis de multilocus de enzimas, como por homología con el gene ribosomal 16S, se concluyó que las filogenias así obtenidas son coherentes entre sí; es decir, que existen bacterias no simbióticas cuyos cromosomas se encuentran interdispersos entre los de las bacterias simbióticas. (Segovia, et al., 1991)

Cabe mencionar que en el estudio de revisión taxonómica (Jordan, D.C., 1984) con una colección de cepas de R. leguminosarum, R. trifoli, R. viciae y R. phaseoli propuso que la especie R. leguminosarum, contenía tres biovares (trifoli, viciae y phaseoli).

El hecho de que la diversidad entre los distintos biovares de R. leguminosarum (P. Young, 1985) sea menor que la reportada para el caso de R. leguminosarum bv. phaseoli (Segovia, 1991), tanto por los criterios del gene ribosomal 16S como por el análisis de electrofenotipos, indica que los aislados americanos presentan mayor diversidad genética que los aislados ingleses. Esto puede ser debido a que el frijol tuvo un origen mesoamericano y, por tanto, la poza genética de R. phaseoli en América es mayor que en Europa.

Los frijoles europeos tienen un origen americano que se remonta al Siglo XV, estas cepas llevaron una parte de la poza genética de R. phaseoli, la cual tuvo que interaccionar con las cepas nativas hasta seleccionar cepas nodulantes, mientras que en América, la relación R. phaseoli-frijol era mucho más antigua y contiene la totalidad de la poza genética de R. phaseoli.

Estas observaciones, están de acuerdo con la propuesta de que; si se comparan dos poblaciones semejantes y se encuentra que una presenta mayor diversidad genética que la otra, entonces la primera se encuentra más cerca del origen de dispersión.()

A partir de las evidencias experimentales presentadas en este capítulo, es obvio que la taxonomía fenotípica en Rhizobium ya no ofrece una alternativa real para estudiar la filogenia del Rhizobium phaseoli, ya que se han reportado:

- a) cepas sin pSim incapaces de nodular cuyos cromosomas son idénticos al de una cepa simbiótica.
- b) cepas con capacidades simbióticas diferentes pero con cromosomas similares.
- c) cepas con la misma composición plasmídica, pero diferente cromosoma.
- d) transferencia genética horizontal de plásmidos simbióticos a fondos genéticos distintos, que permite la generación de nuevas variantes con capacidades adaptativas distintas.
- e) plasticidad intrínseca del genoma de R. phaseoli.

A partir de estos datos, se propone que una alternativa para el estudio filogenético de R. phaseoli es a través de la característica más particular de estas bacterias, sus plásmidos simbióticos.

II. OBJETIVO.

El objetivo principal de esta investigación es obtener la estructura filogenética de la población de aislados naturales, así como en un conjunto de cepas pertenecientes a otros Rhizobia con base en las secuencias del pSim.

Dentro de este análisis, está contemplado conocer la presencia de secuencias específicas como nifH y la presencia de otras secuencias provenientes del plásmido pa de la CFN42, así como la presencia y el grado de conservación de secuencias del cromosoma de la cepa CFN42. Esta última será utilizada para comparar la estructura filogenética que se obtiene con la del plásmido simbiótico.

III. MATERIALES Y METODOS.

1) Organismos

1.1) Cepas utilizadas de Rhizobium (Ver Tabla I)

1.2) Phaseolus vulgaris
Frijol, variedad "Negro Jamapa"

2) Medios de Crecimiento

2.1) Para Rhizobium phaseoli
Medio de cultivo PY, para 1000 ml.
Extracto de levadura 3 g.
Peptona de caseína 5 g.
H₂O c.b.p. 1000 ml.

Después de esterilizar por autoclave, se adicionó 10 ml. de una solución 0.7 M de CaCl₂.

En caso de medio sólido, se agrega 15 g de Agar bacteriológico por litro.

2.1.1) ANTIBIOTICOS. Cuando fue necesario utilizar antibióticos para cepas de R. phaseoli, se usaron las siguientes concentraciones.

<u>Nombre</u>	<u>Símbolo</u>	<u>Solución Stock</u> <u>(100 x)</u>	<u>Concentración</u> <u>final en</u> <u>microgramos/ml</u> <u>(1 X)</u>
Rifampicina	(Rif)	10 mg/ml en Metanol	100
Ampicilina	(Ap)	10 mg/ml en H ₂ O	100
Tetraciclina	(Tc)	1 mg/ml en Etanol	10
Kanamicina	(Km)	3 mg/ml en H ₂ O	30
Estreptomicina	(Sm)	10 mg/ml en H ₂ O	100
Nalidixico	(Nal)	2 mg/ml en NaOH 0.1 M	20
Cloramfenicol	(Cm)	1.5 mg/ml en Etanol	15
Espectinomina	(Sp)	10 mg/ml en H ₂ O	100
Neomicina	(Neo)	6 mg/ml en H ₂ O	30
Gentamicina	(Gm)	10 mg/ml en H ₂ O	100

2.2) Para Phaseolus vulgaris

Solución nutritiva Fahraeus.

<u>Compuesto</u>	<u>Solución Stock (100 X)</u>	<u>Para 1000 ml (1 X)</u>
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	(1.5 g /100 ml)	10 ml
KH ₂ PO ₄	(1 g /100 ml)	10 ml
CaCl ₂	(1 g /100 ml)	10 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	(1.2 g /100 ml)	10 ml
Citrato Férrico	(0.05 g/100 ml)	10 ml
Trazas Gibsón	(1000 x)	1 ml
H ₂ O		c.b.p. 1000 ml

Trazas Gibson 1000 X para 1000 ml

H ₃ BO ₃	2.860 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	2.030 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.080 g
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.100 g
H ₂ O	c.b.p. 1000 ml.

3) Condiciones de Crecimiento

3.1) Para R. phaseoli. Los inóculos se obtuvieron de colonias.

- En medio líquido, se utilizó un tubo de 16 X 150 mm con 3 ml de medio PY y se incubó a 30°C, 200 rpm, por 14 horas aproximadamente.
- En medio sólido, las cajas se incubaron a 30°C, por 2 ó 3 días.

3.2) Para P. vulgaris.

- Germinación.

Las semillas se lavaron con agua, después se incubaron por un minuto en etanol, seguido de un lavado con agua y después se incubaron en una solución de cloralex al 30% durante 15 minutos, seguido de un lavado exhaustivo con agua.

Las semillas así tratadas se sembraron en agar al 0.7% y se incubaron por dos días en completa obscuridad.

- Crecimiento en matraz.

En matraces de 250 ml, conteniendo 200 ml de solución nutritiva Farraheus y 0.7% de agar en condiciones estériles, se plantaron las semillas germinadas y se incubaron en oscuridad por 3 días a 30°C.

Al término de esta incubación, las plantas se pasaron al cuarto de cultivo. Las condiciones ambientales son las siguientes: Humedad 60%, Fotoperíodo 12 horas, Temperatura 29°C, Tiempo entre 13 y 15 días.

- Crecimiento en jarras.

Las jarras contienen vermiculita y 500 ml de solución nutritiva Fahraeus en condiciones estériles. En este caso se plantan las semillas germinadas y se incuban directamente en el cuarto de cultivo.

- Crecimiento en jarras con tierra.

En este caso, se agrega la vermiculita hasta 5cm antes de la boca de la jarra, se agrega 3 cm de tierra y se termina de llenar con vermiculita. También lleva 500 ml de solución nutritiva Fahraeus.

4) Inoculación de P. vulgaris con R. phaseoli.

En todos los casos en los que se van a inocular plantas con una cepa específica de R. phaseoli, ésta proviene de un crecimiento en líquido de PY de 3 ml. Los cultivos se centrifugan y se lavan con 3 ml de $MgSO_4$ 10mM. (Centrifugación 3000 rpm/10 minutos) Se concentran en 1 ml y se inocula con 200 ul de esta suspensión para cada planta germinada.

5) Aislamiento de R. phaseoli de nódulos.

Las plantas que presentan nódulos de los cuales se quiere aislar R. phaseoli, se tratan de la siguiente manera:

Dentro de una campana de flujo laminar, se saca la planta deseada ya sea de matraz o de jarra de cultivo y se cortan las puntas de la raíz y el tallo (facilidad de manejo). Las raíces noduladas se lavan con agua varias veces y al final se lava con agua estéril. Los nódulos se desprenden con pinzas de disección y se lavan con agua estéril en cajas de petri. Después, se agrega una solución de Cloralex al 30% y se incuban

por 5 minutos. Se decanta la solución y se lavan exhaustivamente de 3 a 5 veces con agua estéril. Los nódulos así tratados son aplastados con las pinzas de disección y estriados en cajas de Petri conteniendo PY, Nal (se recomienda hasta 8 nódulos por caja). Las cajas así inoculadas, se incuban por 3 días a 30°C.

6) **Aislamiento de cepas de Rhizobium phaseoli naturales del suelo de Tepoztlán, Mor.**

Se recolectó tierra de un campo de Tepoztlán, Mor. (Piñero, et al.), se cernió por una malla aproximadamente 0.8 cm y se almacenó a 4°C en el laboratorio. En las condiciones de crecimiento anteriormente descritos, se puso esta tierra en contacto con Phaseolus vulgaris y al término de la incubación, se aislaron nódulos. De los nódulos se obtuvieron cepas de Rhizobium phaseoli en PY Nal. Estas cepas fueron reinoculadas en P. vulgaris en condiciones de nodulación en matraz. Se repitió el paso anterior y se seleccionaron inicialmente 200 cepas.

7) **Obtención de patrones electroforéticos de plásmidos de alto peso molecular por la técnica de Eckhardt.**

- 1) A partir de su cultivo de 3 ml en PY de R. phaseoli crecido 12 horas, se toman 0.6 ml y se centrifugan por 1 minuto en la microcentrífuga y se decanta el sobrenadante con jeringa.
- 2) Se agrega 0.5 ml de Sarcosyl 0.1% en TE 50:20, pH 8.0 y se resuspende la pastilla celular. Centrifugar por 1 minuto y descartar el sobrenadante con jeringa.
- 3) Almacenar la pastilla celular a -20°C (al menos, 10 minutos)
- 4) La lisis celular se realiza en el pozo de un gel de agarosa al 0.7% en amortiguador de Tris-Boratos pH 8.2.
- 5) Con 10 ul de TE 50:20, pH 8.0 se resuspende la pastilla celular y se deposita suavemente en un pozo del gel que contiene 40 ul de solución A. Se homogeniza cuidadosamente y se deja por 10 minutos en esta condición.
- 6) Se agrega 40 ul de solución B y se mezcla cuidadosamente con tres pasadas de un émbolo de micropipeta.
- 7) Se agrega 100 ul de solución C y se sella el pozo con la misma agarosa fundida con la que se preparó el gel.

- 8) Se somete el gel a electroforesis por 1 hora a corriente constante de 8 mA por gel. Después, se aumenta la corriente de 35 mA a 40 mA por gel (170 V) por 4 horas.
- 9) El gel se tiñe con EtBr, (10') y se lava con H₂O por 15 minutos para ser observado a la luz ultravioleta. Para el caso de fotografía, conviene dejarlo en H₂O durante toda la noche en el cuarto frío.

Soluciones

Amortiguador Tris-Boratos, pH 8.2 1 X TB. 5 X (1000 ml)

Tris-hidroxi metil-amino metano	- 89 mM	Trizma Base	54 g
EDTA (Na ₂)	- 12.5 mM	0.5 MEDIA, pH8	20 ml
Acido Bórico	- 8.9 mM	Acido Bórico	27.5 g
		H ₂ O c.b.p.	1000 ml

Las soluciones para Eckhardt, se diluyen en amortiguador de Tris-Boratos (TB IX, pH 8.2)

Solución A (para 10 ml)

- 1) Pesar 2 g de Ficoll y disolver en 7 ml de amortiguador TB IX, pH 8.2
- 2) Agregar 2 mg de Lisozima (37 500 u/mg) y disolver.
- 3) Añadir 3.5 ul de una solución de RNA asa (85 u/mg) 10 mg/ml en TB IX, pH 8.2, hervida a 98°C/2 minutos y disolver.
- 4) Agregar 5 mg de azul de bromofenol y 5 mg de xilencianol.
- 5) Aforar a 10 ml con TB IX, pH 8.2

Alicuotar en 1 ml y almacenar a 4°C

Solución B

SDS 0.2%

FICOLL 10%

TB IX, pH8.2 c.b.p.

Solución C

SDS 0.2%

FICOLL 5%

TB IX, pH 8.2 c.b.p.

El ficoll utilizado es 400 000

8) Aislamiento de DNA total de Rhizobium

- 1) De un cultivo de 3 ml en PY incubado de 14 a 16 horas a 30°C, se recuperan las células por tres centrifugaciones sucesivas 3000 rpm en tubos Ependorff de 1.5 ml.

- 2) La pastilla celular se lava por centrifugación con 1 ml de amortiguador Tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8.
- 3) Resuspender en 0.4ml de TE 50:20 pH 8, se agrega 0.05 ml de una solución de pronasa (5 mg/ml predigerida 1 hora, a 37°C en TE 50:20, pH 8) y 0.05 ml de SDS al 10% en TE 50:20, pH 8. Mezclar por inversión.
- 4) El resuspendido se pasa 3 veces con una jeringa al través de una aguja del # 20 después otras 3 veces con una aguja del # 25.
- 5) Extraer dos veces con 0.5 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1) y una vez con 0.5 ml de cloroformo. Durante cada extracción la fase acuosa se separa por centrifugación en una microfuga a velocidad máxima durante 10 minutos a 4°C, recuperando la fase acuosa con una micropipeta automática de 1 ml.
- 6) Agregar 1 ml de Etanol y dejar precipitando 2 horas a -20°C.
- 7) Centrifugar y descartar el etanol (15' a 4°C en microcentrífuga), secar la pastilla por 5 minutos en el evaporador SAVANT, resuspender en 0.5 ml de TE 50:20, pH 8. Agregar 200 ul incubando por 1 hora a 37°C de una solución de RNAasa (tratada a 98°C, 15 minutos (10 mg/ml) en TE 50:20 pH 8).
- 8) Repetir extracción de fenol:cloroformo:isoamílico como en los pasos 5 y 6.
- 9) Centrifugar 15 minutos a 4°C en una microfuga y decantar el sobrenadante, secar la pastilla por 5' en el evaporador SAVANT y resuspender en 0.05 ml de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8, guardando las soluciones a -20°C.
- 10) Con 2 ul de esta solución, se determina la concentración de DNA por medio de una electroforesis en un gel de agarosa corrido a 100 V durante una hora, y tñiéndolo con Brumuro de Etidio.

Soluciones

Tris 1 M, pH 8

Trizma-base (SIGMA) 121.14 g
 H₂O 950.00 ml
 El pH se ajusta con HCl (concentrado)
 Aforar a 1000 ml con H₂O, filtrar y esterilizar.

- 2) Lavado con NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M por 15 minutos, dos veces.
- 3) Lavado con Tris-HCl 0.5 M/NaCl 1.5 M por 30 minutos, dos veces.

La transferencia se lleva a cabo en forma de "sandwich". Los filtros de nitrocelulosa (previamente hervidos por 10' en H₂O) se embeben en una solución de SSC6X, y se ponen en contacto directo con el gel, encima se ponen 2 filtros de papel Whatman 3 MM y 10 toallas Kleenex dobladas. Todo este paquete se encuentra entre dos vidrios, al cual se le pone un peso de 1 kg y se deja a temperatura ambiente por 12 horas.

Al término de la transferencia, los filtros de nitrocelulosa se marcan de acuerdo a los pozos del gel y se embeben en SSC6X. Los filtros así tratados, se secan a temperatura ambiente entre toallas kleenex y se hornean por 2 horas a 80°C sometidos a vacío.

Soluciones

- | | |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) HCl 0.25 M

HCl 20.4 ml
H₂O c.b.p. 1000 ml. 3) Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, pH 7.4

Trizma-Base 60.57 g
NaCl 87.6 g
Ajusta pH a 7.4 con HCl
H₂O c.b.p. 1000 ml 4) SSC 20 X

Citrato de Sodio 88.2 g
NaCl 175.2 g
H₂O c.b.p. 1000 ml | <ol style="list-style-type: none"> 2) NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M

NaOH 19.99 g
NaCl 87.6 g
H₂O c.b.p. 1000 ml 5) SSC 6 X

SSC 20 X - 300 ml
H₂O c.b.p. 1000 ml |
|--|--|

12) Hibridización tipo Southern.

- 1) Los filtros de nitrocelulosa que se van a hibridizar, se incuban en 25 ml de solución de prehibridización, durante 2 horas a 65°C. (Para el caso de Eckhardt, se recomienda incubar toda la noche).
- 2) Se descarta la solución de prehibridización y se agregan 25 ml de solución de hibridización, más el volumen de sonda radiactiva y se incuban por 12 horas a 65°C.
- 3) Al término de la hibridización, se descarta la solución en el lugar de desecho radiactivo y se agrega

20 ml de SSC 2 X, 0.1% SDS para enjuagar y descartar como desecho radiactivo.

- 4) Los filtros son lavados con 40 ml de SSC 2 X, 0.1% SDS por 15 minutos.
 - 5) Se descarta la solución anterior y se incuban a 55°C con 40 ml de SSC 0.1 X, 0.1% SDS, por 15 minutos.
 - 6) Se descarta la solución anterior y en las mismas condiciones se lavan por 30 minutos más.
 - 7) Al término, se descarta la solución y los filtros se lavan a 55°C por 30 minutos con 40 ml de SSC 0.1 X.
 - 8) Los filtros se secan entre hojas de papel absorbente a temperatura ambiente y luego se incuban por 10 minutos en el horno a 65°C.
 - 9) Los filtros se fijan dentro de los "cassettes" de autorradiografía con una placa autorradiográfica colocada en la obscuridad y se exponen a -70°C.
 - 10) Las placas se revelan y se fijan. (Si por carril hay 2×10^6 cpm, bastan 4 horas de exposición).
- 13) **Marcado radiactivo con CTP (^{32}P) de sondas específicas con el método de "Nick translation" de Amersham. Co.**

Generalmente, se utilizan los siguientes criterios de marcaje radiactivo:

- a) Si los carriles a hibridizar son de DNA digerido, basta 1×10^6 cpm por carril
- b) Si se trata de Eckhardt, entonces son necesarios 2×10^6 cpm por carril.

En nuestras condiciones de marcado se obtienen aproximadamente 100×10^7 cpm con 1 μl de CTP(^{32}P) = 10 u Ci, es decir 1 u Ci = 1×10^6 cpm. La radiactividad específica varía de acuerdo con la pureza y el tamaño del fragmento de DNA que va a marcarse.

Se utiliza el "kit de Nick translation" de Amersham incubando la reacción por 2 horas a 14°C.

La separación de marca radiactiva libre se realiza a través de una columna de 1 ml con Sephadex G-75.

La mezcla de reacción se lleva a 0.3 ml, los cuales se aplican a la columna, se dejan pasar y se agrega 0.6 ml de amortiguador de columna. Se colecta esta fracción 5 μl de la muestra, se cuantifica usando un "PROBE COUNTER" para determinar los CPM y se multiplica el resultado por 1860 (factor del aparato) para conocer el número de CPM totales en la sonda radiactiva. La sonda radiactiva se desnaturaliza a 98°C por 10

minutos colocándola inmediatamente a 4°C por 10 minutos. Una vez tratada así, se agrega a los filtros para hibridización.

Soluciones

PREHIBRIDIZACION (100 ml)

H₂O (HPLC) - 50 ml
FÓSFATOS - 10 ml
SSC 20 X - 25 ml
DENHARDT - 10 ml
DNA carrier - 5 ml (previamente incubado a 98°C, 10' y 4°C, 10').

HIBRIDIZACION (100 ml)

H₂O (HPLC) - 52.5 ml
FÓSFATOS - 10 ml
SSC20X - 25 ml
DENHART - 10 ml
DNA carrier - 2.5 ml (igual al anterior)
DNA (32 P) - a lo más 0.6 ml.

FOSFATOS 1 M (1000 ml), pH 6.7

NaH₂PO₄·H₂O (0.5 M) 34.39 g
Na₂HPO₄·7H₂O (0.5 M) 67.019 g
H₂O c.b.p. 1000 ml

DENHART

Ficoll - 2%
PVP - 2% (POLIVINILPIRROLIDONA)
BSA - 2% (SEROALBUMINA)

(Conviene preparar 100 ml y almacenar a -20°C)

DNA carrier

5mg DNA solución/ml H₂O

Este DNA es pasado por agujas de jeringa varias veces y almacenando a -20°C.

Buffer de Columna

		(Concentración final)
Tris 1 M, pH 8	- 2 ml	(10 mM)
NaCl 5 M	- 4 ml	(100 mM)
EDTA 0.25 M, pH 8	- 0.8 ml	(1 mM)
SDS	- 0.02 g	(0.01%)
H ₂ O	- c.b.p. 200 ml	

Resina

10 g Sephadex G-75/200 ml de buffer de columna, se esteriliza en la autoclave por 20 minutos, se deja enfriar y se almacena a 4°C.

METODO DE MAXIMA PARSIMONIA PARA LA CONSTRUCCION DE ARBOLES FILOGENETICOS.

El programa computacional utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos, fue el PHYLIP 34. Este tipo de programa construye topologías (arreglos probables de similitud entre cepas) por el método de máxima parsimonia. El método consiste en inferir el número mínimo de cambios necesarios para que las cepas se parezcan entre sí.

En nuestro caso, los datos suministrados son los fragmentos de DNA total de cada cepa obtenidos al restringir con la enzima Bam H1 o Eco R1, revelados en patrones de hibridización contra diferentes secuencias del pSim o del cromosoma de la CFN42.

RESULTADOS Y DISCUSION

1) ANALISIS DE R. phaseoli, DE AISLADOS NATURALES DEL SUELO DE TEPOZTLAN, MOR.

El genoma de R. phaseoli tiene una gran capacidad para cambiar su organización genética a través de rearrreglos genómicos que incluyen tanto a secuencias plasmídicas como cromosomales y que comprenden entre otros: deleciones, amplificaciones e inversiones (Flores, et al., 1988, Flores et al., Girard, et al., 1991, Brom et al., 1991, Romero, et al., 1991). Estos fenómenos han sido estudiados en condiciones controladas de laboratorio. Si R. phaseoli es capaz de generar tanta variabilidad en su genoma en condiciones in vitro, entonces, se espera encontrar una variabilidad mayor en condiciones in vivo.

Esta hipótesis fue sometida a experimentación al aislar cepas naturales de una población de R. phaseoli procedentes de una área menor a un metro cuadrado de suelo, de un terreno donde se cultiva Phaseolus vulgaris (frijol). En estas condiciones, se buscó que el hábitat fuera muy restringido y por tanto el nicho ecológico, ya que la hipótesis a evaluar, es que a pesar de lo restringido de la zona, R. phaseoli es capaz de generar una gran variabilidad en cuanto a su organización genómica, medida por el número de plásmidos que contiene cada cepa, así como la posición relativa de migración electroforética por la técnica de Eckhardt.

Los aislados naturales de R. phaseoli del suelo de Tepoztlán, fueron obtenidos como se describe en Materiales y Métodos. Los criterios utilizados para definir a las cepas como R. phaseoli fueron los siguientes: 1) capacidad de nodulación de Phaseolus vulgaris (frijol variedad "Negro Jamapa"), 2) crecimiento a 30°C en medio de cultivo PY Na1²⁰ y 3) incapacidad de crecimiento a 37°C o en medio de cultivo Luria.

Las 207 cepas que se aislaron de los nódulos y que se mantuvieron en medio sólido PY Na1²⁰, fueron corroboradas como cepas nodulantes al reinocularse en plantas de frijol en condiciones de cultivo del laboratorio.

Cabe mencionar que todas las cepas eran capaces de producir melanina en condiciones de medio sólido PY Na1²⁰, aunque en diferente cantidad y a distintos tiempos. Posteriormente, se analizaron 50 cepas (ver Tabla I) con la adición de tirosina y cobre, seguida de una lisis celular con SDS para observar la producción de melanina. En estas condiciones, todas las cepas producen melanina en una concentración y en un tiempo muy similar.

Las 207 cepas fueron sometidas a la técnica de Eckhardt a fin de conocer el número y el perfil de plásmidos que contenía cada cepa.

En la Figura 4, se muestran algunos perfiles de plásmidos y se observa una gráfica de distribución de cepas, de acuerdo al número de plásmidos que contienen. De acuerdo con estos datos, encontramos que la distribución de plásmidos por tablas de contingencia no es homogénea para una $p > 0.001$; y que

el 54% de la población, son cepas que contienen 4 plásmidos. No se detectaron cepas con más de siete plásmidos o cepas carentes de ellos. El número de plásmidos por cepa en la población presenta un comportamiento estadístico de distribución normal.

En cuanto a los perfiles plasmídicos, definimos nueve tipos distintos, de los cuales, cuatro tipos contienen diferente número de subtipos y los 5 restantes no (Fig. 5). Para el caso más abundante, el del tipo llamado 1, lo forman 11 subtipos diferentes; hay 9 subtipos para el tipo 3, cuatro para el tipo 2 y tres para el tipo 4. Cabe mencionar que el 46% de las cepas analizadas pertenecen al tipo 1. Un análisis por tablas de contingencia indica que la frecuencia de aparición del número de plásmidos por tipo no es homogénea.

Estos datos sugieren que si bien hay una variabilidad en cuanto al número y tamaño de los plásmidos en la población natural de R. phaseoli, cuando se aíslan cepas capaces de nodular existe una estructura genómica más frecuente y que hay límites bien definidos en cuanto al número de plásmidos en la población (ya que no se detectaron cepas sin plásmidos ni con un número superior a 6).

La existencia de patrones plasmídicos representados por una sola cepa indica que el universo genético es más amplio que el encontrado, pero con una frecuencia para su aislamiento menor a 10^{-2} . Para demostrar que se han aislado cepas representativas de todos los tipos posibles sería necesario hacer un aislado de R. phaseoli de otro metro cuadrado y demostrar que en esta población no se presenta ningún tipo diferente a los nueve

descritos.

¿Cuáles son los factores que determinan la organización genómica en Rhizobium phaseoli? ¿Es posible que la presencia de la planta contribuya en esta selección?. Es importante señalar que los aislados de R. phaseoli analizados en este trabajo, se obtuvieron de un terreno donde se cultiva el frijol desde hace más de 50 años, por lo que probablemente, la población existente de R. phaseoli ha estado en contacto con el frijol.

El hecho de que todos los aislados obtenidos nodulen a Phaseolus vulgaris indica que contienen la información genética necesaria para la simbiosis. A fin de evaluar en estos aislados la presencia y el tipo del plásmido simbiótico, se realizó el siguiente experimento: para identificar la presencia de las secuencias nifHDK, se sometieron las cepas a una extracción de DNA total y para evaluar la presencia del pSim la técnica de Eckhardt. Los DNAs fueron fragmentados con la endonucleasa de restricción Bam H1 y transferidos a filtros de nitrocelulosa para ser hibridizados contra el pCQ15 (contiene nifHDK), mientras que el DNA proveniente de Eckhardt fue hibridizado contra p15b (nifH) y pCQ12(nifHDK).

Para el caso de pCQ12 y p15b encontramos que las 109 cepas dieron señal positiva (ver Fig. 6) en un plásmido que era de un tamaño similar en todas ellas.

Al analizar las cepas que mostraron señal positiva con pCQ15 en su DNA total, el 55% presentó un patrón de hibridización semejante al de la CFN42, en tanto que el 45%

restante mostró un patrón diferente.

En este último caso, mientras que la reiteración de nifHb migra en forma similar a la cepa CFN42, las reiteraciones de nifHa y nifHc lo hacen en forma distinta. (Ver Fig. 7). Estos datos son similares a los reportados por Martínez, et al., (1985).

Otra estrategia utilizada para esta caracterización, fue analizar la presencia de secuencias localizadas en el plásmido a de la cepa CFN42 en los aislados de R. phaseoli. En este experimento, de 160 cepas analizadas, sólo 42 dieron señal positiva; 38 cepas mostraron un patrón semejante de migración molecular al que presenta la CFN42 y 4 de ellas mostraron hibridización en un plásmido de menor tamaño. (Fig. 8).

La cepa que se utilizó como modelo de comparación fue aislada en el Estado de Guanajuato (CFN42), mientras que la población de R. phaseoli analizada en este trabajo proviene del Estado de Morelos.

De los datos presentados podemos concluir que:

- 1) La distribución de los plásmidos no es homogénea para una $p < 0.001$ y el 54% de la población contiene 4 plásmidos.
- 2) De los nueve tipos descritos por el perfil plasmídico, las tablas de contingencia indican que la frecuencia de aparición del número de plásmidos por tipo no es homogénea, y que el 46% de las cepas se agrupa en el

tipo 1.

- 3) La presencia del plásmido simbiótico en las cepas analizadas indica que el peso molecular es semejante en todas las cepas y un poco mayor al de la CFN42. (aproximadamente 550 kb).
- 4) En todos los casos, se observó la reiteración de los genes nifHDK, aunque se encontraron dos tipos de patrón de hibridización. Uno semejante al observado en la CFN42 en el 55% de la población y en el 45% restante un patrón diferente.
- 5) De 160 cepas analizadas, sólo 42 dieron señal positiva contra secuencias de pa de la CFN42. Treinta y ocho cepas hibridizaron con éste en un plásmido de peso molecular equivalente mientras que 4 de ellas lo hicieron con un plásmido de menor tamaño.
- 6) El hecho de encontrar en la población de R. phaseoli de Tepoztlán un patrón semejante de reiteración de los genes nifHDK al presentado por la CFN42 (aislada de Guanajuato), así como la presencia de estos genes en un plásmido, puede indicar un origen común para el pSím de estas dos poblaciones.

A fin de evaluar esta hipótesis, decidimos analizar la

estructura filogenética entre los distintos aislados naturales de R. phaseoli, comparando con distintas secuencias del plásmido simbiótico de la cepa CFN42.

Para realizar este experimento, seleccionamos 50 cepas, las cuales representan a todos los tipos y subtipos definidos, que hibridizan claramente con los genes nif.

2) ANALISIS DE LA SIMILITUD ENTRE CEPAS AISLADAS DE TEPOZTLAN, A TRAVES DE LAS SECUENCIAS DEL PLASMIDO SIMBIOTICO DE LA CEPA CFN42.

Las 50 cepas utilizadas en este análisis se encuentran descritas en la Tabla I. Como se puede observar en esta tabla, las cepas representan a todos los tipos identificados, además de que se indican algunas características relevantes como número de plásmidos, tipo de hibridización con los genes nif y el pa de la CFN42.

Los DNA's de estas cepas fueron obtenidos como se describe en Materiales y Métodos, fragmentados con la endonucleasa de restricción Bam HI, sometidos a electroforesis en geles de agarosa, seguidos de una transferencia a filtros de nitrocelulosa para ser hibridizados contra cósmidos del plásmido simbiótico de la cepa CFN42.

El pSim de la cepa CFN42 ha sido purificado en nuestro laboratorio y se ha obtenido un mapa de su estructura física (Girard, et al., 1991), el cual se encuentra representado en la

Fig. 9. En el análisis, se utilizaron 10 de los 16 cósmidos que contienen clonada la información genética del pSim, los cuales se encuentran indicados en la Fig. 9 y representan el 90% de todo el pSim.

En la Fig. 10 se indica el tipo de secuencias contenidas en cada uno de los cósmidos utilizados en estos experimentos. En la Fig. 11 se ejemplifica el tipo de patrones de hibridización que se observa en estas cepas con tres cósmidos distintos. Los patrones de hibridización resultan sumamente complejos y contienen en promedio hasta 22 bandas diferentes.

El hecho de que todos los cósmidos dieran señal con todas las cepas analizadas, y que esta señal cuando se analiza por Eckhardt, se observe en el plásmido que hibridiza con los genes nifHDK (dato no mostrado), sugiere fuertemente un origen común para el plásmido simbiótico. Como se muestra en la Fig. 12, las secuencias contenidas en el cósmido cGD103 presentaron mayor variabilidad para la población analizada, mientras que cGD7, cGD170 y cGD51 resultaron los menos variables.

La variabilidad observada en los patrones de hibridización que se revelan con los distintos cósmidos, no guarda una relación directa con algunos genes simbióticos que sabemos que los contienen. (Ver Fig. 10) Topológicamente, los cósmidos cGD170 y cGD51 se encuentran uno al lado del otro, mientras que el cGD7 se localiza enfrente de cGD170 (ver Fig. 9). Sin embargo, tampoco es evidente buscar una relación entre la topología de los fragmentos en relación al plásmido simbiótico y su grado de variabilidad o conservación en la

población de R. phaseoli analizada. Estos datos nos sugieren que dentro de la estructura del plásmido simbiótico, existen regiones sujetas a mayor presión de selección que otras. El criterio que utilizamos para el análisis de esta información, consistió en comparar el patrón de hibridización observado en cada cepa; sólo en el caso de que todas las bandas fueran compartidas con la misma relación de intensidades, se consideraron como idénticos. La información así evaluada, se sometió a un análisis por computadora y se obtuvo el dendrograma que se muestra en la Fig. 13.

En este tipo de análisis cada patrón idéntico encontrado para cada cósmido utilizado, se consideró como un electroferotipo de una enzima, sometiéndolo al mismo tipo de análisis.

Como puede observarse, las cincuenta cepas analizadas se hallan agrupadas en 4 grandes grupos (I,II,III,IV); sorpresivamente, 8 de ellas resultaron ser idénticas en su patrón de hibridización para todos los cósmidos.

Con respecto al primer grupo (I), es de llamar la atención que todas las cepas que lo integran pertenecen al tipo nif2 de hibridización, mientras que en el grupo III, se caracteriza porque todas las cepas pertenecen al patrón de hibridización nif1, semejante al de la cepa CFN42. Tanto el grupo II, como el grupo IV, contienen cepas de ambos tipos, pero el patrón de hibridización tipo nif1 es mayoritario en el grupo II y el tipo de hibridización nif2 es mayoritario en el grupo IV.

Además, en el grupo IV se encuentran 13 de las 15 cepas que contienen secuencias similares al *pa* de la CFN42 y en el grupo II no existen cepas con estas características.

Respecto a las 8 cepas que resultaron idénticas en su patrón de hibridización con todos los cósmidos, también se observa que todas ellas muestran señal de hibridización con el plásmido *pa*, pertenecen al tipo de hibridización nif2 y todas ellas se agrupan en el tipo 3 de perfil plasmídico. Es decir, bajo todos estos criterios de evaluación, estas cepas sólo se distinguen por su perfil plasmídico. (Ver Fig. 14)

Con estos datos, podemos concluir que:

- 1) El hecho de que los cósmidos analizados revelen una cantidad de bandas semejante a la que aparece en la CFN42 para cada cósmido, indica un grado de conservación cercano al 100%. Sin embargo, para cada cósmido se observó también polimorfismo en los patrones de hibridización, lo que indica un grado de variabilidad específica para cada región.
- 2) El hecho de que el 16% de la población analizada resulte idéntica en su patrón de hibridización para los 10 cósmidos y que sólo sean distinguibles por su patrón plasmídico, puede indicar que la organización de la información extracromosomales distinta o que teniendo una organización idéntica otros elementos extracromosomales pueden ser adquiridos por trans-

ferecia horizontal.

- 3) El hecho de que haya zonas más variables dentro de la estructura del plásmido simbiótico puede estar en relación directamente con tasas de cambio diferentes en función de la dispensabilidad que para la simbiosis tenga la región.

Con el fin de analizar la información genética contenida en el plásmido simbiótico de estas cepas desde el punto de vista filogenético, se realizó un experimento semejante al anterior, pero se incluyeron otros R. phaseoli de distinto origen geográfico y se seleccionaron cepas representativas de los cuatro grupos (I,II,III,IV) reportados en el dendrograma.

3) ANALISIS FILOGENETICO ENTRE CEPAS AISLADAS DE TEPOZTLAN Y OTROS TIPOS DE Rhizobium, A TRAVES DE LAS SECUENCIAS DEL PLASMIDO SIMBIOTICO.

Las cepas de que se utilizaron se encuentran listadas en la Tabla II. Para este análisis, se incluyeron distintas especies de Rhizobium (R. fredii, R. tropici, R. meliloti, R. trifoli, R. viciae) y Rhizobium phaseoli de distintos orígenes geográficos (Balice, Brasil, Hawaii, E.U.A. y México). Además, de cepas aisladas de Tepoztlán, representativas de los cuatro grupos reportados en el dendrograma.

Los DNA's de estas cepas fueron obtenidos como se describe en Materiales y Métodos, fragmentados con la endonucleasa de restricción Bam HI, seguidos de una transferencia a filtros de nitrocelulosa, para ser hibridizados contra la colección de 10 cósmidos que contienen el 90% de las secuencias del plásmido simbiótico de la cepa CFN42.

A partir de los patrones de hibridización obtenidos, se realizó el siguiente análisis:

El número de bandas de hibridización que presenta la cepa CFN42 con un cósmido particular, se le asignó un valor de 100% de hibridización. Con este valor, se calculó el porcentaje de hibridización para cada cepa en función del número de bandas que se observan. Cabe mencionar, que en este tipo de análisis, no se tomó en cuenta las intensidades relativas de hibridización. (Ver Fig. 15)

Con este criterio de análisis, encontramos que el promedio de hibridización para los 10 cósmidos utilizados fue el siguiente: 12.4% para los distintos tipos de Rhizobium, 83.2% para los Rhizobium phaseoli de distinto origen geográfico y 102.2% para los R. phaseoli aislados de Tepoztlán.

En el caso de los cósmidos cGD28 y cGD51, no se observó hibridización con ninguna de las cepas representativas de las otras especies de Rhizobium, lo cual nos sugiere fuertemente que estas regiones del plásmido simbiótico de la cepa CFN42 son específicas de Rhizobium phaseoli.

Agrupando las cepas en el orden decreciente para el porcentaje de hibridización tenemos: R. tropici con el 22.9% ;

18.8% para R. fredii; 12.4% para R. meliloti; 4% para R. trifolii y 3.3% para R. viciae.

Para los Rhizobium phaseoli de distinto origen geográfico encontramos el siguiente orden: 90% para VIK (Belice); 85.7% para TAL (Hawaii, E.U.A.); 85% para NIT (E.U.A.) y 72% para BRA (Brasil).

Estas observaciones apoyan nuestra hipótesis de que el plásmido simbiótico puede ser una alternativa de estudio para la filogenia de Rhizobium; ya que aún con un análisis grueso es posible distinguir diferentes tipos de Rhizobium.

A partir de éstos datos; decidimos profundizar más en el análisis a través de la construcción de árboles filogenéticos mediante un programa computacional denominado PHYLIP 34, el cual construye árboles filogenéticos por el método de máxima parsimonia.

Para llevar a cabo este análisis fue necesario construir matrices, en las cuales, los renglones son las cepas y las columnas indican la presencia de una banda de hibridación como "1" y su ausencia como un "0". Estas matrices fueron construidas específicamente para cada patrón de hibridación de todas las cepas con un cósmido particular.

Con estos datos, el programa realiza arreglos espaciales de similitud entre las distintas cepas y genera el número máximo de arreglos igualmente probables. Una vez obtenidos estos arreglos, se pide al programa que construya el arreglo consenso y de esta manera se obtiene el árbol filogenético deseado.

Es evidente, que el grado de distorsión en un árbol filogenético depende tanto del número como de la calidad de los datos que se utilicen. Por tal razón; en este tipo de análisis no se incluyeron las cepas pertenecientes a otras especies de Rhizobium, ya que el número de bandas de hibridización es bajo.

Cabe mencionar que cuando se incorporaron los distintos Rhizobia al análisis, el árbol filogenético resultante siempre presentó una rama lejana que agrupa a todas estas cepas (dato no mostrado).

La metodología empleada para la comparación entre distintos árboles filogenéticos se basó en el hecho de que: cada nodo en un árbol filogenético une a tres ramas. Cuando las cepas agrupadas en cada rama son las mismas entre dos árboles se le asigna un valor de 0. Cuando sólo se cumple para el caso de una rama, se le asigna un valor de 2/3 y cuando las tres ramas agrupan cepas distintas, se le asigna un valor de 1.

De esta forma, se puede tener un valor numérico de comparación y se puede establecer un porcentaje de diferencia entre distintos árboles filogenéticos.

Para la construcción de los árboles filogenéticos, utilizamos las siguientes estrategias:

- 1) Construcción del ARBOL FILOGENETICO SIMBIOTICO, este se obtiene con los patrones de hibridización de todas las cepas con todos los cósmidos.

- 2) Construcción del ARBOL SIMBIOTICO-1, este se obtiene con el árbol consenso y suprimiendo la información de un cósmido a la vez.
- 3) Construcción del ARBOL TRICOSMIDO, este se obtiene con la información de tres cósmidos y se va corriendo uno a la vez (cGD7-cGD101-cGD28; cGD101-cGD28-cGD15, etc.)
- 4) Construcción del ARBOL COSMIDO, este se obtiene con la información de cada cósmido.

Debido a que en la obtención de estas construcciones filogenéticas, la cepa CFN42 se mostraba en una rama lejana al resto de las cepas, se realizó el mismo tipo de análisis pero en ausencia de la CFN42.

El árbol consenso obtenido con todos los datos de hibridización, que incluye los diez cósmidos y las catorce cepas le donominamos ARBOL FILOGENETICO SIMBIOTICO (árbol simbiótico) (Fig. 16a).

Con el objeto de evaluar cual era el peso específico de la información contenida en cada cósmido en el árbol simbiótico, se compararon por porcentaje de diferencias, árboles simbióticos a los cuales se les fue suprimiendo un cósmido (10-cGD7, 10-cGD101, 10-cGD28, etc.). (Ver Fig. 17).

El porcentaje de diferencias fue igual a 0, para los casos del ARBOL SIMBIOTICO con 10-cGD28, 10-cGD15, 10-cGD51, y 10-cGD47, lo cual implica que estos árboles son idénticos al

simbiótico. Estos datos sugieren que para R. phaseoli las secuencias contenidas en estas regiones, tienen poco peso filogenético para distinguir entre cepas y probablemente sean regiones conservadas.

Para los casos 10-cGD7 y 10-cGD101 el porcentaje de diferencias con el ARBOL SIMBIOTICO fue de 14%, para cGD103 fue del 34%. Siguiendo el argumento anterior cGD28, cGD15, cGD7 y cGD101 contienen secuencias nif y nod, lo cual indica que son secuencias altamente conservadas en R. phaseoli y por tanto, al excluirse de la filogenia no generan distorsiones.

El caso contrario a los anteriores lo encontramos en 10-cGD45 con 76% de diferencias al ARBOL SIMBIOTICO, 10-cGD179 con 66% y cGD170 con 56%. Estos cósmidos parecen contener información importante para distinguir filogenéticamente las cepas de R. phaseoli.

El promedio de diferencias de los diez arreglos con el árbol simbiótico es de 25.9%.

Cuando se comparan cada uno de éstos arreglos (por ejemplo 10-cGD7 vs 10-cGD28, 10-cGD15, etc.) con los otros nueve, los resultados son consistentes con las observaciones anteriores. Las máximas diferencias siempre se observan al comparar 10-cGD179, 10-cGD170 y 10-cGD45 y el resto son proporcionales.

Como se observa en la Fig. 18 donde se muestran los diferentes árboles filogenéticos obtenidos. Las cepas VIK, NIT, TAL y BRA siempre se encuentran agrupadas y en 6 de los 10 árboles, la cepa CFN42 forma una rama independiente, en la cual

se divide el árbol entre las cepas aisladas de Tepoztlán y los R. phaseoli de distinto origen geográfico.

El árbol filogenético simbiótico muestra que la agrupación de cepas aisladas de Tepoztlán es congruente con la organización obtenida en el dendrograma, ya que las cepas se mantienen unidas por los grupos ya identificados. (I,II,III,IV).

Cuando se hizo el análisis en ausencia de CFN42, la modificación más importante en el árbol simbiótico, es en la agrupación de cepas del tipo I y II, ya que aparecen mezclados. Sin embargo, los R. phaseoli de distinto origen geográfico se siguen agrupando en una sola rama diferente a la de los aislados de Tepoztlán. (Ver Fig. 17b)

El promedio en porcentaje de diferencias entre el árbol simbiótico construido en presencia de CFN42 y en ausencia de la misma es solo del 2.8%, ya que el promedio de diferencias con el árbol simbiótico en presencia de CFN42 es de 25.9% y en el caso que no se incluyó CFN42 es de 28.7%.

Tratando de buscar zonas en el plásmido simbiótico que contribuyeran con mayor peso en este estudio filogenético, se hicieron análisis de árboles tricósmidos, en los cuales se agruparon de tres en tres los cósmidos contiguos. Los árboles obtenidos fueron comparados entre sí y con el árbol filogenético simbiótico tanto en presencia como en ausencia de la CFN42.

El promedio de diferencias con el árbol simbiótico construido con CFN42 fue de 65%, mientras que en ausencia de CFN42 fue de 64.4% lo que hace una diferencia entre ambos de sólo 0.6%. Sin embargo, en la Fig. 19, se puede observar que en

ausencia de la CFN42 hay una distribución en forma de campana donde los máximos se encuentran en los arreglos cGD45-cGD103-cGD170 y cGD170-cGD51-cGD179. Cuando se incluye CFN42 la distribución no es homogénea y se detectan cuatro máximos: cGD7-cGD101-cGD28; cGD101-cGD28-cGD15 y cGD170-cGD51-cGD179; cGD179-cGD47-cGD7. Curiosamente, en el primer caso el porcentaje mayor de diferencias se encuentra en el centro y en el segundo caso, se encuentra a los extremos. Lo cual señala 2 regiones una en frente de la otra dentro de la estructura del plásmido simbiótico, como zonas de mayor peso filogenético.

Al analizar los árboles filogenéticos obtenidos para cada uno de los cósmidos por separado y compararlos con los árboles simbióticos construidos tanto en presencia como en ausencia de la cepa CFN42, se observa que el promedio de diferencias encontrado en presencia de CFN42 es de 80.8% y de 74.2% para el caso donde no se incluye CFN42. La diferencia entre ambos es de 6.6%.

Los cósmidos con menor diferencias al árbol simbiótico fueron cGD101 y cGD51 tanto en presencia como en ausencia de CFN42. Ver Fig. 20.

El aumento en el porcentaje de diferencias es debido al número de datos que se analizan, ya que al construir el árbol simbiótico se utilizó una matriz de 14x230 y en el caso de cGD15 y cGD170 son matrices de 14 x 16. Sin embargo, a pesar de la gran diferencia de datos es sorprendente que haya al menos un 20% de similitud entre los árboles filogenéticos que se construyen con un sólo cósmido vs el construido con 10.

Esta observación, es indicativa de que el peso de la información en la construcción de árboles filogenéticos por el método de máxima parsimonia depende de la cantidad y calidad de los datos. Por tal razón, el programa genera todos los árboles de semejante probabilidad y es necesario construir el consenso.

4) **ANALISIS DEL AGRUPAMIENTO DE CEPAS AISLADAS DE TEPOZTLAN Y DE R. phaseoli DE DISTINTO ORIGEN GEOGRAFICO A TRAVES DE COSMIDOS CON SECUENCIAS EXCLUSIVAS DEL CROMOSOMA DE LA CEPA CFN42.**

Este experimento se llevó a cabo en forma similar al anterior, sólo que en este caso los DNA's fueron restringidos con la endonucleasa de restricción ECO R1 y la hibridización tipo Southern se realizó, utilizando cuatro clonas aisladas del DNA de la cepa CFN42, las cuales se probaron por su falta de hibridización con cualquiera de los megaplásmidos identificados por Eckhardt en la cepa CFN42.

Las clonas se encuentran en el cósmido de p LAFRy contienen: a) La clona 1; 18 kb b) La clona 2; 20 kb c) La clona 3; 22 kb y d) La clona 4; 24 kb.

Los resultados de este análisis, también pueden ser sometidos a una comparación del patrón de hibridización banda a banda de cada cepa y para cada clona y con estos datos se alimenta el programa de agrupamiento de cepas por el método de

máxima parsimonia a fin de generar árboles filogenéticos. En el árbol consenso de todas las clonas cromosomales (ver Fig. 21) se observa que la cepa CFN42 es la más separada del agrupamiento, en uno de los extremos se agrupan las cepas 2G18, 2M21, MM16 y en una derivación quedan 1M11 y 2M20 mientras que en la otra derivación 1G2 y 1CH9 quedan relacionadas. Hacia el otro extremo de la rama se forman dos derivaciones claras. Una de ellas que agrupa a BRA, MM30, y 2CH3 y otra en la que se encuentran VIK, NIT y TAL.

Si comparamos el árbol filogenético consenso obtenido con secuencias cromosomales vs el árbol filogenético consenso obtenido con secuencias del plásmido simbiótico podemos concluir que las historias evolutivas del cromosoma y del plásmido simbiótico en Rhizobium phaseoli son distintas ya que encontramos un 83.3% de diferencias entre ellas.

CONCLUSIONES

a) El trabajo presentado en esta tesis; es el primer caso donde se realiza un análisis filogenético tomando como parámetro evolutivo el 90% del DNA contenido en el plásmido simbiótico (pSim 390 kb) de la cepa CFN42.

b) El hecho de encontrar una conservación cercana al 100% de las secuencias contenidas en el pSim de la CFN42 aislada del estado de Guanajuato al compararla con cepas de distintos orígenes geográficos, nos sugiere un origen común para el pSim.

c) Las diferencias observadas en el grado de polimorfismo nos indica un grado de variabilidad específica para cada región.

d) En el pSim no todas las secuencias participan con el mismo peso filogenético; ya que hay regiones altamente conservadas y otras con mayor variabilidad. En este sentido el pSim cumple con los requisitos para ser usado como cronómetro evolutivo.

e) Dado que al comparar el árbol filogenético simbiótico con el árbol filogenético cromosomal obtuvimos un 83.9% de diferencias, esto sugiere; que la historia evolutiva del cromosoma y del plásmido son diferentes, o bien que el grado de distorsión interna en cada una de estas dos estructuras es muy elevado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Brom, S., Martínez, E. Dávila, G. y Palacios R. (1988). "Narrow-and broad host-range symbiotic plasmids of Rhizobium spp. strains that nodulate Phaseolus vulgaris". App. Environ. Microbiol. 54:1280-1283.
2. Brom, S., García de los Santos, A. Stepkowsky, T., Flores, M. Dávila, G. Romero, D. y Palacios, R. (1992). "Different Plasmids of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance" J. Bacteriol. 174:
3. Flores, M. González, V. Brom, S. Martínez, E. Piñero, D. Romero, D. Dávila, G. y Palacios, R. (1987). "Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium spp". J. Bacteriol. 169:5782-5788.
4. Fox, G.E. Stackebrandt, E. Hespell, R.B.Gibson, J. Maniloff, J. Dyer, T.A. Wolfe, R.S. Balch, W.E. Tanner, R. Magrum, L. Zablen, L.B. Blakemore, R. Gupta, R. Bonen, L., Lewis, B.J. Sthal, D.A. Luehrsen, K. R. Chen, K.N. y Woose, C.R. (1980). "The phylogeny of prokaryotes". Science 209: 457-463.
5. Girard, M.L. Flores, M. Brom, S. Romero, D. Palacios, R., y Dávila, G. (1991). "Structural Complexity of the Symbiotic Plasmid of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli. J. Bacteriol. 173:2411-2419.
6. Hedges, R.W. (1972). Heredity. 28:39-48.

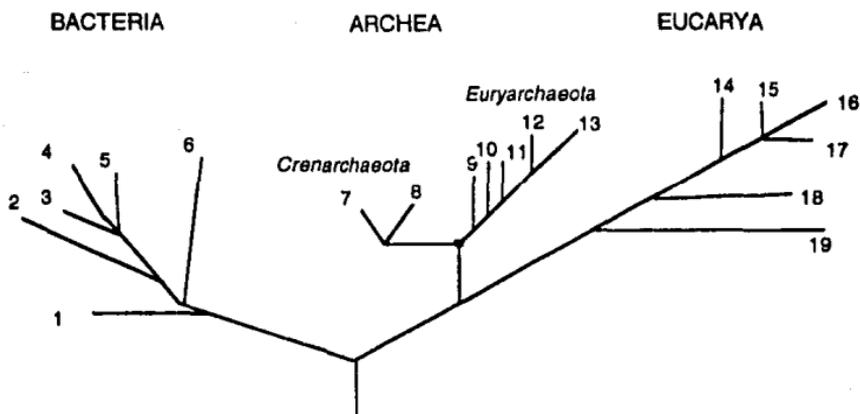
7. Jarvis, B.D.W. Ward, L.J.H. y Slade, E.A. (1989). "Expression by soil bacteria of nodulation genes from Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. App. Environ. Microbiol. 55: 1426-1434.
8. Jordan, D.C. (1984). "Family III. Rhizobiaceae Conn. 1938, 321 al., p.234-254. En N.R. Krieg and J.G. Holt. (ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. William and Wilkin's, Baltimore.
9. Martínez, E. Pardo, M.A. Palacios, R. y Cevallos, M.A. (1985). "Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris." J. Gen. Microbiol. 131:1779-1786.
10. Martínez, E., Flores, M. Brom, S. Romero, D. Dávila, G. y Palacios, R. (1988). Rhizobium phaseoli: a molecular genetics view." Plant Soil. 108:179-184.
11. Martínez, E. Palacios, R. y Sánchez, F. (1987). "Nitrogen-fixing nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids. J. Bacteriol. 169:2828-2834.
12. Martínez, E. Romero, D., y Palacios, R. (1990). "The Rhizobium genome". Annl. Rev. Plant. Sci. 9:59-93.
13. Martínez-Romero, E. Segovia, L. Martín's, F. Franco, A. Graham, P. y Pardo M.A. (1991). "Rhizobium tropici, a novel species nodulating Phaseolus vulgaris. L. beans and

Leucaena sp. Trees".

International Journal of Systematic Bacteriology. 41:417-426.

14. Mayr, E. (1982) "Growth of Biological Thought. Belknap Press. Cambridge, Mass.
15. Piñero, D. Martínez, E. y Selander, K. (1988). "Genetic Diversity and relationships among isolates of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli". Appl. Envirom. Microbiol. 54: 2825-2832.
16. Romero, D. Brom, S. Martínez-Salazar, J. Girard y M.L., Palacios, R. y Dávila, G., (1991). "Amplification and Deletion of a nod-nif region in the Symbiotic plasmid of Rhizobium phaseoli. J. Bacteriol. 173:2435-2441.
17. Segovia, L. Piñero, D. Palacios, R. y Martínez-Romero, E. (1991). "Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic Rhizobium leguminosarum". Appl. Envirom. Microbiol. 57:
18. Segovia, L. Tesis de Doctorado. U.N.A.M. (1991). Taxonomía y Filogenia de cepas de Rhizobium leguminosarum.
19. Whittaker, R.H. y Margulis, L. (1978). Biosystems. 10:3-18.
20. Woese, C.R. (1987). "Bacterial Evolution". Microb. Revws. 51: 221-271.
21. Woese, C.R. (1992). "Prokaryote Systematics: The evolution of a science". En "The prokaryotes". 2nd. Edit. por Balows, A., Trüper, H.G., Dnorkin, M., Harder, W., and

- Schleifer, K.H. Spring. Verlag. pp. 3-18.
22. Young, J.P.W. (1985). "Rhizobium population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans and lucerne grow at the same site". J. Gen. Microbiol. 131: 2399-2408.
23. Young, J.P.W. (1992). "Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms". En "Biological Nitrogen Fixation". Ed. Stacey, G., Burris, R.H., and Evans, H. Chapman and Hall. pp. 43-86.



ARBOL FILOGENETICO UNIVERSAL, PROPUESTO POR WOESE Y COL. (1990) LA POSICION RELATIVA DE LAS RAMAS FUE DEFINIDA POR EL ANALISIS DE RNA RIBOSOMAL 16s.

Fig. 1

FAMILIA RHIZOBIACEA

Género	Especie	Planta Hospedera
Rhizobium	melloti	Alfalfa y Trigonella
	leguminosarum	
	biovar viciae	Chicharo
	biovar trifolii	Trébol
	biovar phaseoli	Frijol
	loti	Lotus
	galegae	Galega
	fredii	Soya
	ninglangensis	Soya
Bradyrhizobium	japonicum	Soya
Azorhizobium	caulinodans	Sesbania
Agrobacterium	tumefaciens	
	rhizogenes	Diversas dicotiledóneas
	rubi	
	radiobacter	ninguna
Philobacterium		

FIG. 2

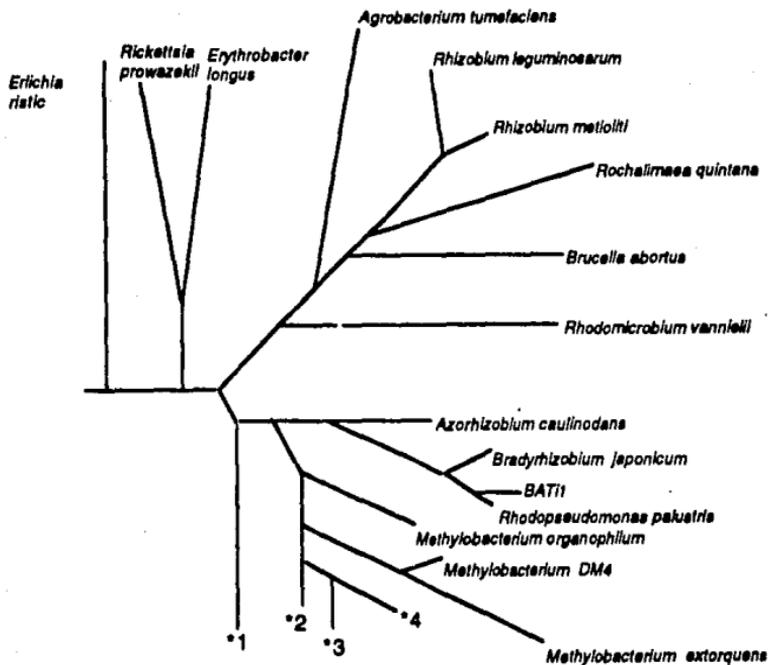


Fig. 3

PERFILES PLASMIDICOS DE AISLADOS NATURALES DE

Rhizobium phaseoli

CEPA MCH25 MCH32 CFN IM7 IM14 IM16 MG6 CFN ICH10 ICH12



DISTRIBUCION DEL NUMERO DE PLASMIDOS POR CEPA EN
LA POBLACION DE Rhizobium phaseoli DE TEPOZTLAN.

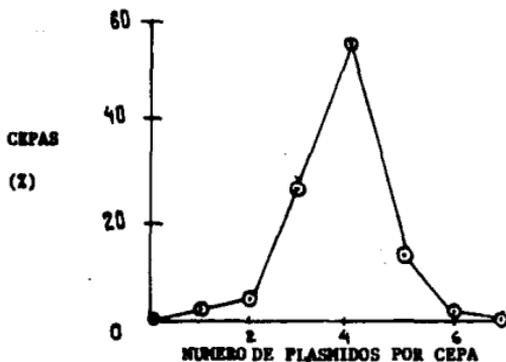


Fig. 4

DIAGRAMA DE LOS DIFERENTES TIPOS Y SUBTIPOS DE PERFILES PLASMIDICOS DE *R. PHASEOLI* AISLADOS DEL SUELO DE TEPOZTLAN

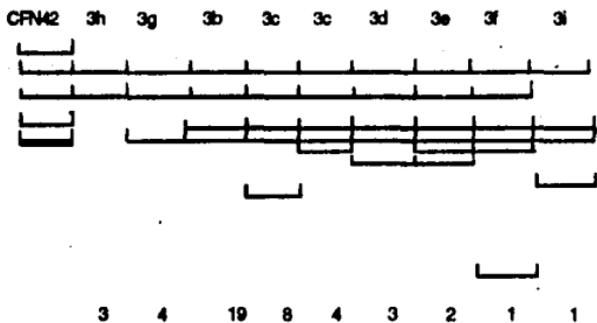
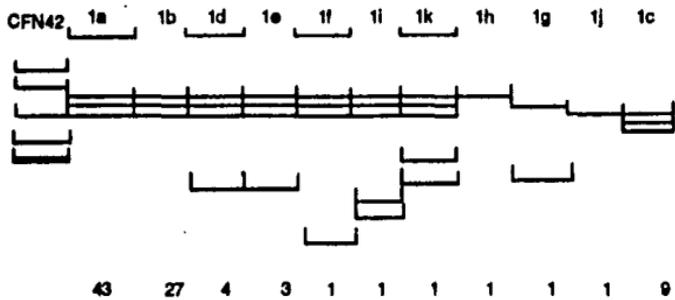


Fig. 5

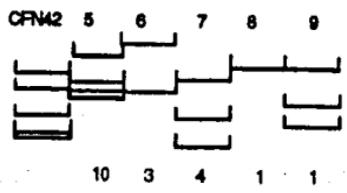
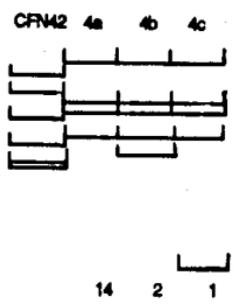
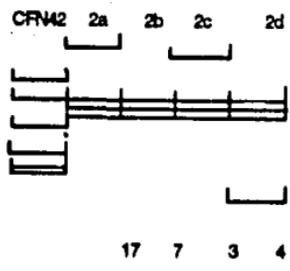


Fig. 5

PATRONES DE HIBRIDIZACION DE GENES nif EN ECKHARD DE AISLADOS
NATURALES DE R.phaseoli DE TEPOZTLAN.

HIBRIDIZACION CON pCQ12

CEPA CFN42 2G10 2G11 2G12 2G13 2G14 2G15 2G16 2G17 2G18



HIBRIDIZACION CON p15b

CEPA CFN42 2G10 2G11 2G12 2G13 2G14 2G15 2G16 2B17 2G18

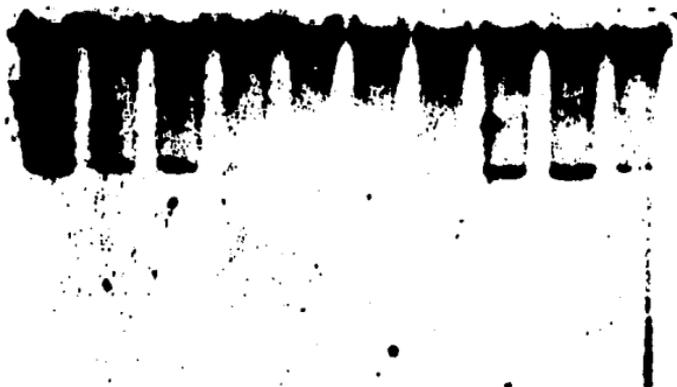


Fig. 6

PATRONES DE HIBRIDIZACION DE GENES nif, EN DNA TOTAL DE
Rhizobium phaseoli AISLADOS DEL SUELO DE TEPOZTLAN

HIBRIDIZACION CON pCQ15

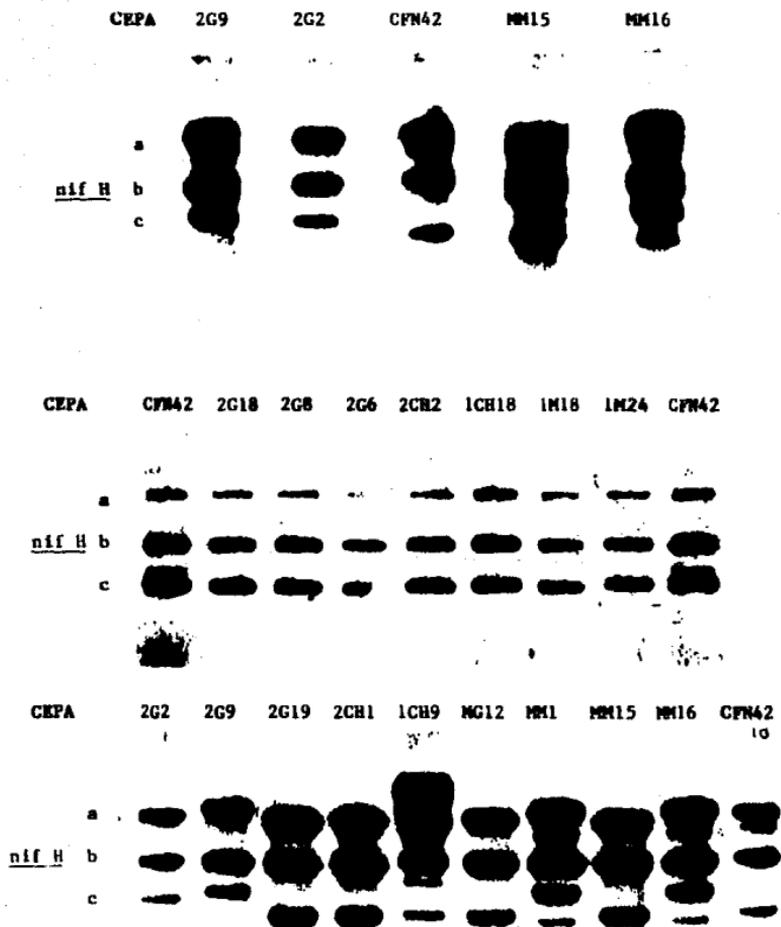


Fig. 7

PATRON DE HIBRIDIZACION DEL PLASMIDO pa DE LA CEPA CFN42
EN ECKHARD DE AISLADOS NATURALES DE Rhizobium phaseoli.

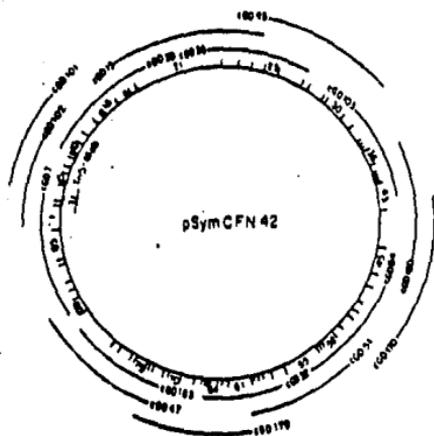
CEPA CFN42



Fig. 8

**MAPA FISICO DEL PLASMIDO SIMBIOTICO (pd) DE LA CEPA CFN42
LOCALIZACION DE LOS COSMIDOS UTILIZADOS PARA EL
ANALISIS DE DISTANCIA GENETICA.**

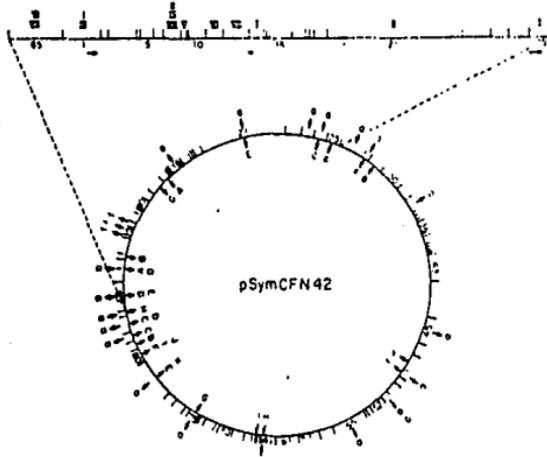
COSMIDOS UTILIZADOS



- 1) cGD 7
- 2) cGD101
- 3) cGD 28
- 4) cGD 15
- 5) cGD 45
- 6) cGD103
- 7) cGD170
- 8) cGD 51
- 9) cGD179
- 10) cGD 47

Fig. 9

LOCALIZACION DE ALGUNOS GENES Y SECUENCIAS REITERADAS EN EL pSym
Y EN LOS COSMIDOS UTILIZADOS. (Girard, et.al. 1991)



IDENTIFICADOS DENTRO DEL pSym

- I - nif H
- II - nif a
- III - nod a
- IV - nod b
- V - nod c
- V - nod d
- VII - nod box

SECUENCIAS DE OTROS PLASMIDOS DENTRO DEL pSym

- (a) - pa de CFN42
- (b) - pb de CFN42
- (f) - pf de CFN42

FAMILIAS DE SECUENCIAS REITERADAS DENTRO DEL pSym

A B C D E F G H I J K

- | | |
|-----------|---|
| 1) cGD7 | pa, pf, ABCDEFH, nif H, nod a, nod d, nod box |
| 2) cGD101 | pa, pf, A G nif H, nif a, nod b, nod c, nod d, nod box. |
| 3) cGD28 | pa A G nif H, nod a, nod box |
| 4) cGD15 | pa C E nif H, nif a |
| 5) cGD45 | pa B F |
| 6) cGD103 | pa |
| 7) cGD170 | pa I, K |
| 8) cGD51 | pa |
| 9) cGD179 | pa J, H |
| 10) cGD47 | pa B, F, I, J, K, E |

Fig. 10

EJEMPLOS DE DISTINTOS PATRONES DE HIBRIDIZACION CON DIFERENTES
COSMIDOS EN AISLADOS NATURALES DE Rhizobium phaseoli.
LOS DNA'S ESTAN RESTRINGIDOS CON Bam HI

CEPA

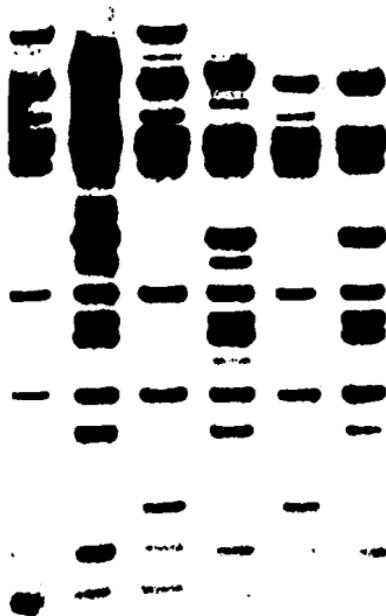


CEPA



Fig. 11

CEPA



cGD

Fig. 11

CONSERVACION DE LOS PATRONES DE RESTRICCION

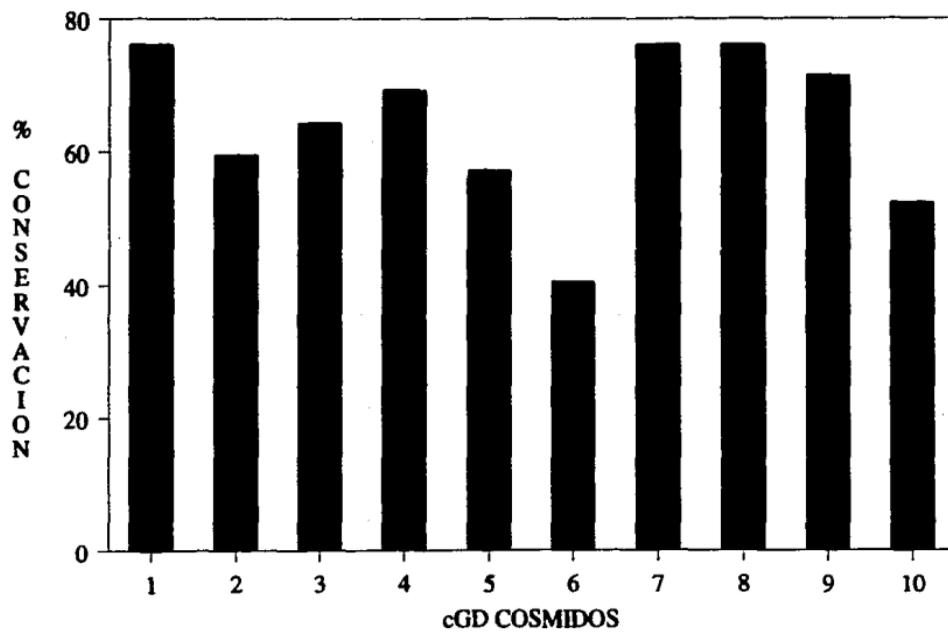


FIG.12

DEMOGRAFIA DE SIMILITUD ENTRE CERAS DE *R. phaeoell*
 AISLADAS DE TEROSTILAN.

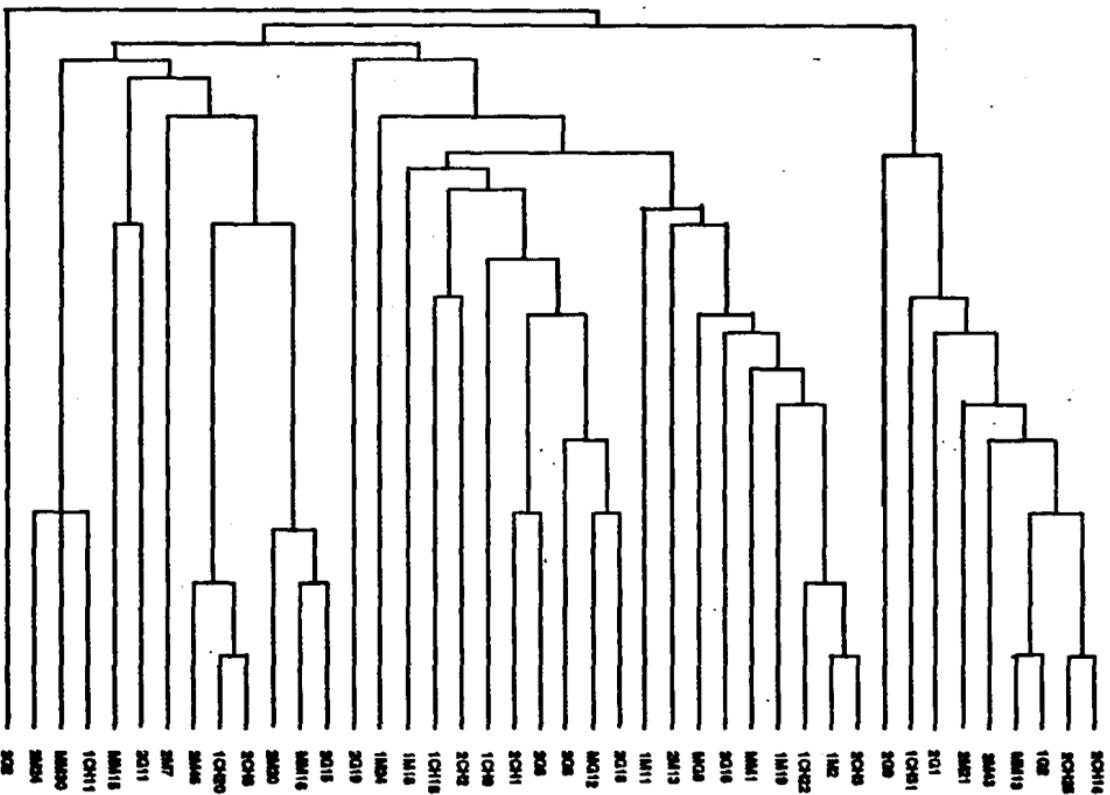


Fig. 13

PATRONES PLASMIDICOS Y DE DNA TOTAL RESTRINGIDO CON Bam HI
DE OCHO CEPAS IDENTICAS POR PATRON DE HIBRIDIZACION CON COSMIDOS
COMPARADAS CON CFN42 Y MM13

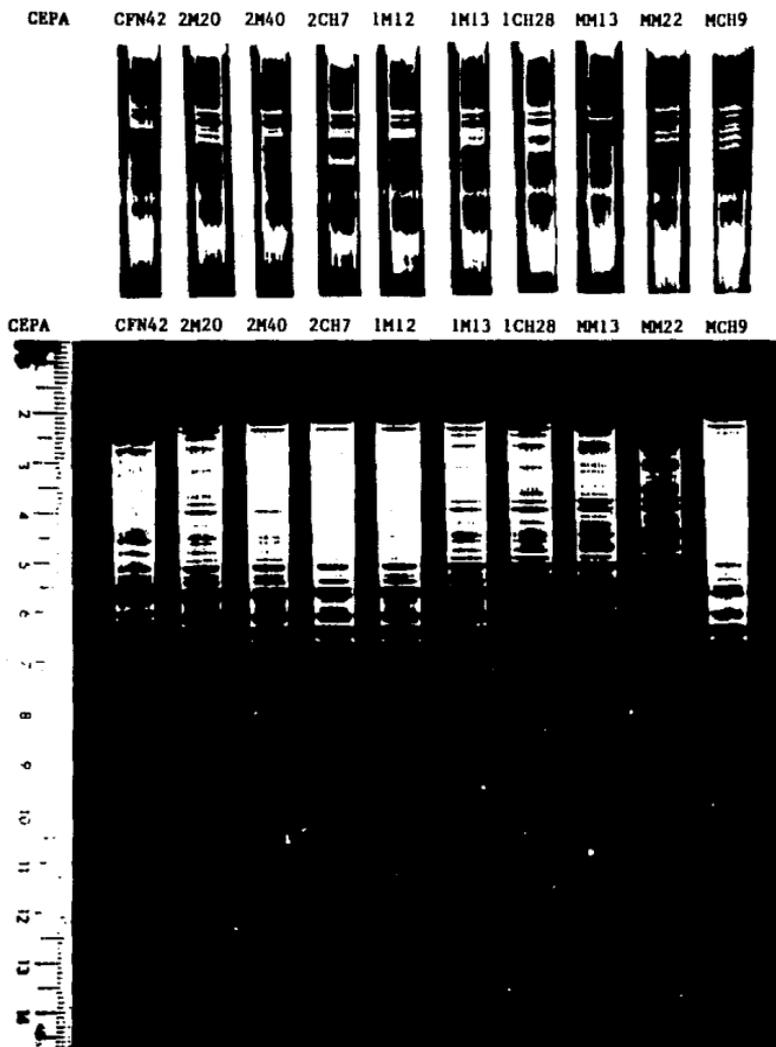


Fig. 14

DISTRIBUCION DE CEPAS POR COSMIDO EN FUNCION DE BANDAS
CONSERVADAS CON CFN42

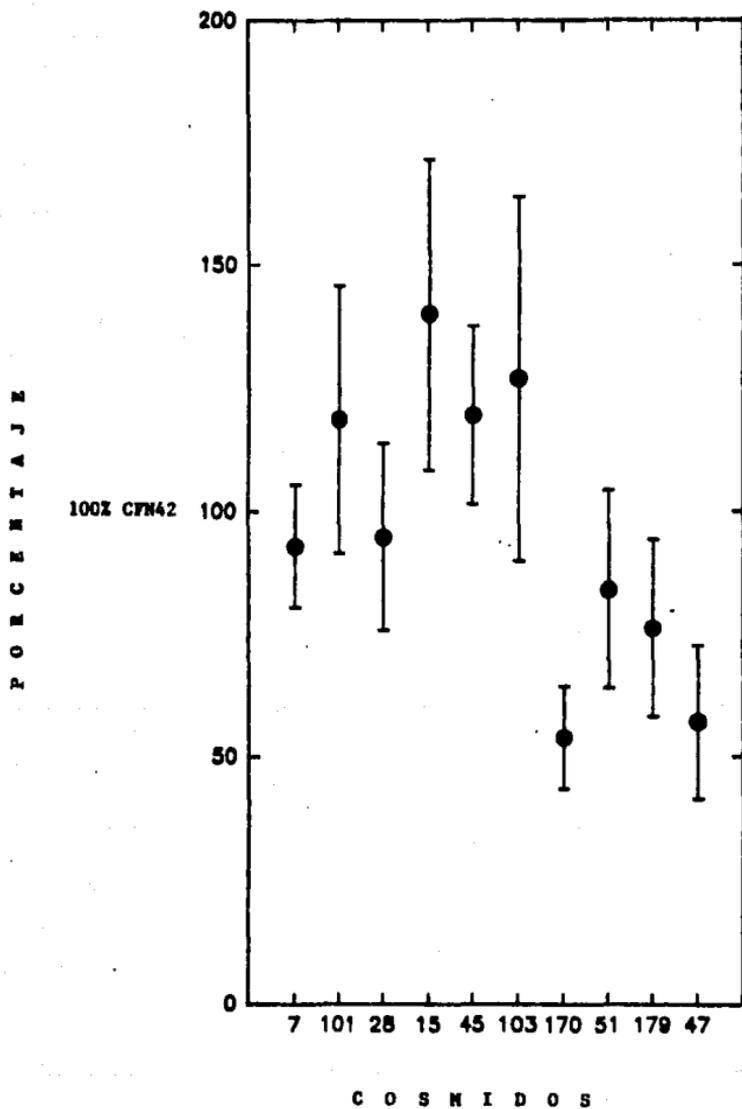
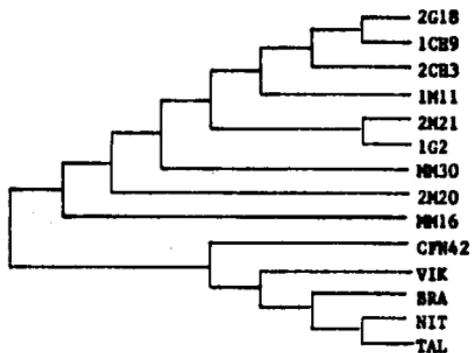
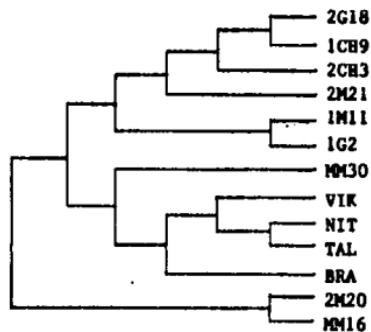


Fig. 15

ARBOLES FILOGENETICOS SIMBIOTICOS



a : ARBOL CONSTRUIDO INCLUYENDO CFN42



b : ARBOL CONSTRUIDO EN AUSENCIA DE CFN42

COMPARACION ENTRE ARBOLES FILOGENETICOS

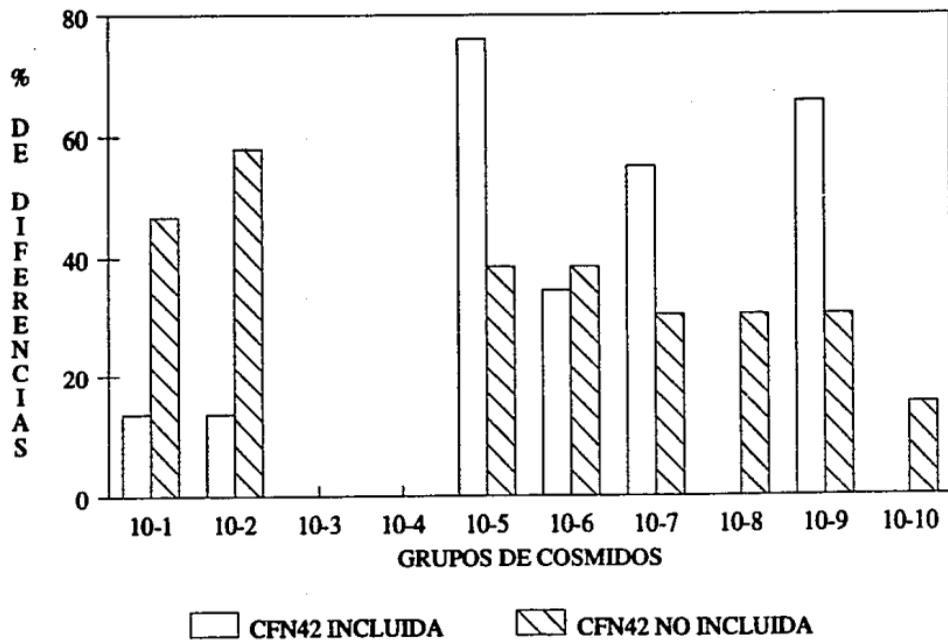
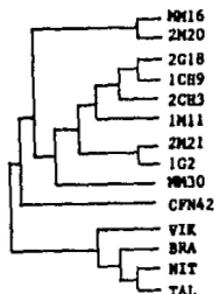
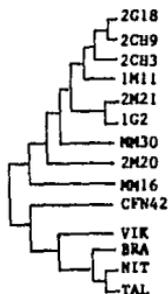


FIG.17

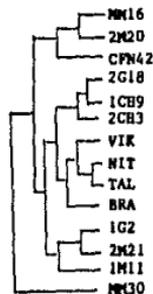
10-cGD7



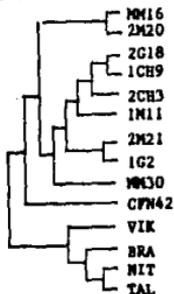
10-cGD15



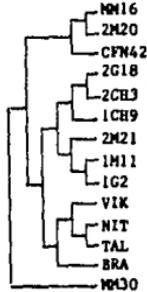
10-cGD170



10-cGD101



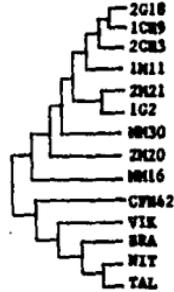
10-cGD45



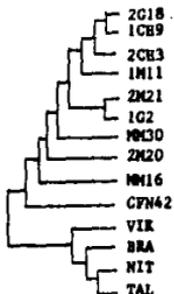
10-cGD51



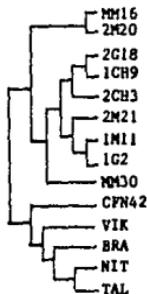
10-cGD47



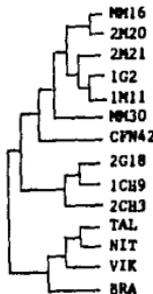
10-cGD28



10-cGD103



10-cGD51



ARBOLES FILOGENETICOS CONSTRUIDOS DEL ARBOL SIMBIOTICO, SUPRIMIENDO UN COSMIDO A LA VEZ.

COMPARACION ENTRE ARBOLES FILOGENETICOS

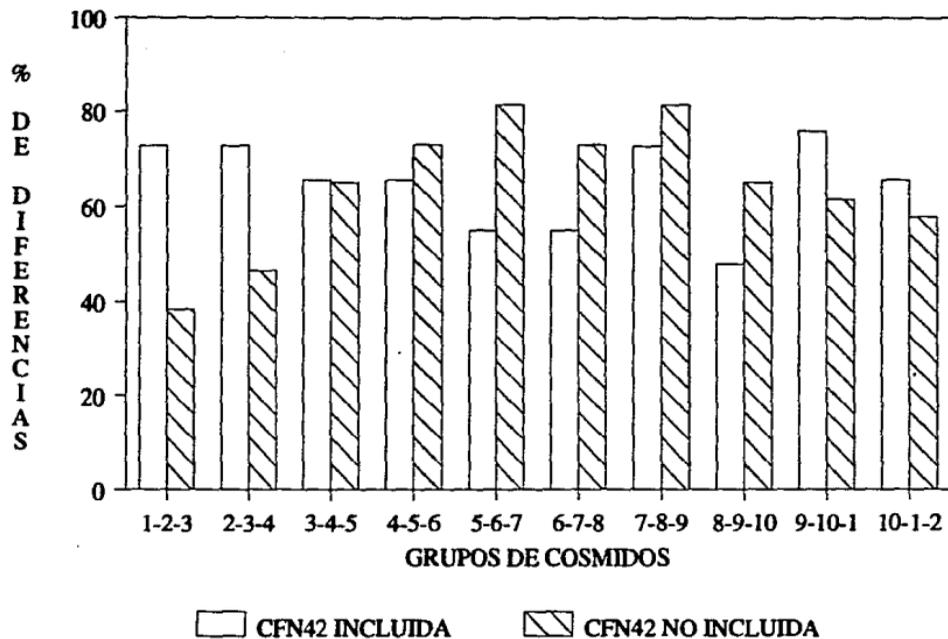


FIG.19

COMPARACION ENTRE ARBOLES FILOGENETICOS

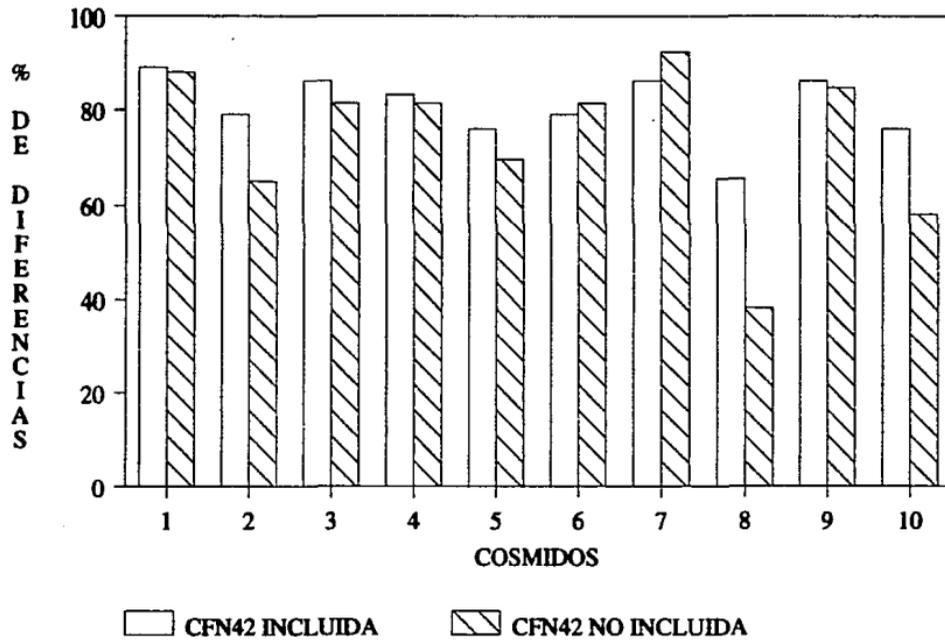
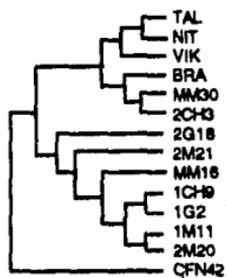


FIG.20

**ARBOL FILOGENETICO
CONSENSO CROMOSOMAL**



83.3% diferencia con el psim

Fig. 21

TABLA I

<u>Número</u>	<u>Nombre</u>	<u>Subtipo</u>	<u>a</u>	<u>nif</u>	<u>No. Plásmidos</u>
1	2CH14	4a		nif2	4
2	2CH25	6		nif2	2
3	1G2	1a		nif2	4
4	MM13	3h		nif2	2
5	2M43	4a		nif2	4
6	2M21	4b		nif2	5
7	2G1	3b	a1	nif2	5
8	1CH31	2a		nif2	4
9	2G9	6		nif2	2
10	2CH3	6		nif1	2
11	1M2	1a		nif1	4
12	1CH22	1i		nif1	1
13	1M19	1a		nif1	4
14	MM1	1k		nif2	6
15	2G16	3g		nif1	3
16	MG8	5		nif1	4
17	2M13	8		nif1	1
18	1M11	4a		nif2	4
19	2G18	2a		nif1	4
20	MG12	1c		nif1	3
21	2G8	2b		nif1	3
22	2G6	3a	a1	nif1	4
23	2CH1	5		nif1	4
24	1CH9	4c		nif1	5
25	2CH2	1b		nif1	3
26	1CH18	1j		nif1	5
27	1M18	1h		nif1	2
28	1M24	1b		nif1	3
29	2G19	7		nif1	3
30	2G15	1c		nif2	3
31	MM16	3e	a1	nif2	6
32	2M20	3a	a1	nif2	4
33	2M40	3i	a1	nif2	4
34	2CH7	3d	a1	nif2	5
35	1M12	3c	a1	nif2	5
36	1M13	3a	a1	nif2	4
37	1CH28	3b	a1	nif2	5
38	MM22	3f	a1	nif2	6
39	MCH9	3e	a1	nif2	6
40	2CH8	3d	a1	nif1	5
41	1CH20	3a	a1	nif1	4
42	2M46	3c	a1	nif1	5
43	2M7	4b		nif1	5
44	2G11	5		nif1	4
45	MM15	9		nif1	3
46	1CH11	2a		nif2	4
47	MM30	1d		nif2	5
48	2M24	2d	a2	nif2	4
49	2G2	7		nif1	3
50	CFN42	0	01	nif1	6

nif1 = nif CFN42
nif2 = nif CFN42

a1 = a CFN42
a2 = a CFN42

TABLA 11

<u>Número</u>	<u>Cepa</u>	<u>Especie</u>	<u>Origen geográfico</u>
1	249	<u>R. tropici</u>	
2	2011	<u>R. meliloti</u>	
3	USDA191	<u>R. fredii</u>	
4	ANU243	<u>R. trifoli</u>	
5	VF39	<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>viciae</u>	
6	CFN42	<u>R. leguminosarum</u> bv. <u>phaseoli</u>	(Gto., México)
7	VIK	-----	(Belice)
8	BRA5	-----	(Brasil)
9	NIT	-----	(EUA)
10	TAL	-----	(Hawaii, EUA)
11	IG2	-----	(Mor., México) Gpo. I
12	2M21	-----	Gpo. I
13	2CH3	-----	Gpo. II
14	1M11	-----	Gpo. II
15	2G18	-----	Gpo. III
16	1CH9	-----	Gpo. III
17	MM16	-----	Gpo. IV
18	2M20	-----	Gpo. IV
19	NM30	-----	Gpo. IV