

03062
12/15



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del C.C.H.

ALCS
SLI/2

Construcción de mutaciones en las regiones nif
de Rhizobium phaseoli

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA

Lorenzo Patrick Segovia Forcella

1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INTRODUCCION

Todos los organismos vivos requieren asimilar del medio ambiente compuestos nitrogenados para sintetizar sus componentes esenciales. En la naturaleza, el nitrógeno se encuentra principalmente en estado gaseoso, constituyendo el 80% de la atmósfera terrestre; sólo un número limitado de microorganismos son capaces de disponer del nitrógeno molecular y de reducirlo a amonio, un componente esencial del ciclo del nitrógeno. Este proceso, denominado fijación de nitrógeno, solo puede ser llevado a cabo por organismos procariotes, tanto aerobios como anaerobios o facultativos, algunas cianobacterias y todas las bacterias fotosintéticas. Su participación es de suma importancia en la biosfera ya que son las responsables de la constante canalización del nitrógeno a compuestos orgánicos nitrogenados.

La fijación biológica del nitrógeno es llevada a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa, el cual consta de dos componentes: la nitrogenasa (componente I) y la nitrogenasa reductasa (componente II). El componente I, también llamado proteína FeMoCo, está compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β y requiere de molibdeno y de hierro para su actividad. El componente II, proteína Fe, es un homodímero que requiere de hierro para su actividad. En el mecanismo de reacción, el componente II es reducido y reacciona con ATP, reduce al componente I el cual a su vez

reduce el nitrógeno atmosférico a amonio.

Las bacterias del género Rhizobium fijan nitrógeno en simbiosis con las raíces de ciertas leguminosas en estructuras altamente diferenciadas llamadas nódulos. Para establecer esta relación simbiótica es necesario un reconocimiento muy específico entre la planta y la bacteria; las bacterias colonizan la superficie de la raíz y se adhieren a las células que van a formar los pelos radiculares; posteriormente las bacterias penetran por los pelos radiculares por las distintas capas celulares de la raíz. Cuando el hilo de infección alcanza la corteza externa se induce una actividad meristemática a distancia de las células de la corteza interna. Cuando las bacterias llegan a estas células, el saco del hilo de infección se abre y la célula vegetal se llena de bacteroides, rodeados de la membrana peribacteroidal. Es en este estado de diferenciación que Rhizobium lleva a cabo la fijación de nitrógeno. El nitrógeno reducido en el nódulo es asimilado por las células vegetales, ya que las enzimas necesarias para la asimilación de amonio están reprimidas en el bacteroide. A su vez los bacteroides reciben de la planta la energía empleada en la reducción de nitrógeno atmosférico (revisado en Martínez et al, aceptado).

ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LOS GENES DE LA NITROGENASA.

Los genes estructurales de la nitrogenasa fueron inicialmente caracterizados en Klebsiella pneumoniae, una enterobacteria que fija nitrógeno en vida libre; en este organismo el gene que codi-

fica para el componente II de la nitrogenasa, nifH, y los genes que codifican para el componente I, nifD y nifK, están organizados en un operón (Mac Neil et al., 1978; Merrick et al., 1978; Elmerich et al., 1978).

Estos genes están muy conservados a través de la evolución por lo que hibridizan con secuencias análogas en una gran variedad de organismos fijadores de nitrógeno (Ruvkun y Ausubel, 1980).

En los rhizobias de crecimiento rápido R. meliloti, R. leguminosarum, y R. trifolii el estudio de los genes estructurales de la nitrogenasa ha revelado que se encuentran localizados en plásmidos de alto peso molecular y que también están organizados en operones nifHDK (Ruvkun et al., 1982; Corbin et al., 1982; Ma et al., 1982; Scott et al., 1982 y 1983b).

En los rhizobias de crecimiento lento, Bradyrhizobium japonicum, R. cowpea y en Parasponia Rhizobium, la organización de los genes estructurales de la nitrogenasa es diferente a la anterior ya que nifH está separado de nifD y K por un tramo de DNA de 15 a 20 Kb, formando dos unidades distintas de transcripción. Además estos genes se encuentran en el cromosoma (Scott et al., 1983a).

ORGANIZACION DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LA NITROGENASA EN R. phaseoli.

En Rhizobium phaseoli, simbionte del frijol Phaseolus vulgaris L., se encontró que el gene nifH está reiterado tres veces en un plásmido de alto peso molecular (Quinto et al., 1982). El análisis de la secuencia nucleotídica de cada reiteración mostró

que los genes son idénticos. El análisis por microscopía electrónica de heteroduplex formados entre fagos recombinantes que llevan cada una de las reiteraciones mostró que existe una homología de 5 Kb entre las regiones llamadas nif a y nif b y de 1.3 Kb entre la región llamada nif c y las regiones a y b (ver Fig. 1). El análisis de restricción de las zonas reiteradas demostró que la homología encontrada en los heteroduplex se refleja en la conservación de los sitios de restricción y que estos empiezan a divergir en el sitio donde se pierde la homología. Hibridaciones de tipo Southern de plásmidos recombinantes que llevan cada una de las reiteraciones con detectores heterólogos de Parasponia Rhizobium específicos para nifD y nifK, mostraron que existen secuencias homologas a estos genes en el extremo 3' de los genes nifH de las regiones nif a y b pero no en la región nif c (comunicación personal de C.Quinto)(ver Fig. 1).

La reiteración de secuencias en R. phaseoli no está restringida a los genes de la nitrogenasa sino que es un fenómeno más general, ya que se han encontrado secuencias repetidas tanto en plásmidos como en el cromosoma (Flores et al., 1987).

La reiteración de los genes estructurales de la nitrogenasa es una característica común entre aislados naturales de R. phaseoli. Martínez et al. (1985) reportaron que en 50 aislados independientes estudiados, 48 tenían reiteraciones de los genes estructurales de la nitrogenasa. La reiteración de estos genes también ha sido observada en otras especies de Rhizobium, como es el caso de R. fredii (Prakash y Atherly, 1984), R. trifolii (Wang et

al., 1986) y Rhizobium sp ORS571 (Norel y Elmerich, 1987).

Para explicar la presencia y la identidad de reiteraciones de los genes estructurales de la nitrogenasa, Romero et al. (1988) demostraron que derivadas que llevaban mutaciones en los genes nifH de las regiones nif a o b tenían una capacidad simbiótica menor que la cepa silvestre en cuanto a masa total de nódulos, actividad de nitrogenasa total por planta, actividad específica de nitrogenasa, nitrógeno total en planta y porcentaje de nitrógeno con lo que concluyeron que ambas regiones eran necesarias para una plena capacidad simbiótica en R. phaseoli.

ORGANIZACION TRANSCRIPCIONAL Y EXPRESION DE LOS GENES DE LA NITROGENASA EN R. phaseoli.

La regulación de la transcripción de los genes de la nitrogenasa en R. phaseoli ha sido poco estudiada. El análisis de la secuencia nucleotídica de los extremos 5' de los genes nifH mostró que la identidad se mantiene por 200 pares de bases hacia arriba del codón de iniciación. Dentro de esta zona de homología se encontró la secuencia consenso heptamérica de promotores de los genes nif en K. pneumoniae (Beynon et al., 1983; Ow et al., 1983). Sin embargo solo se encontró a la secuencia requerida para la activación por el producto de nifA en las regiones nif a y b. Esta secuencia esta localizada en el sitio donde divergen las secuencias de las regiones nif a y b de la secuencia de la región nif c en el extremo 5' (Buck et al., 1986). Morett et al. (1988) demostraron mediante el uso de fusiones transcripcionales del

gene lacZ de E.coli con los genes nifH en las regiones nif a y b la expresión regulada de estos genes ya que la actividad de β .galactosidasa era mucho mayor en el nódulo que en vida libre. La expresión del gene nifH de la región nif c no fué claramente demostrada porque las cepas que llevan fusiones lacZ-nifHc presentan rearrreglos a muy alta frecuencia (Morett et al., 1988).

Para definir la organización transcripcional de las regiones nif decidimos obtener cepas que llevaran mutaciones en los genes nifH o nifK en diferentes regiones. Las derivadas obtenidas permitirían definir si en las regiones nif a y b los genes nifH, nifD y nifK forman operones o si existen promotores entre nifH y nifK como se ha observado en otros sistemas.

Aunque se requiera de las dos regiones completas para una actividad óptima hemos observado que en nuestras condiciones no hay diferencias observables entre las capacidades simbióticas de la cepa silvestre y de derivadas que carecen de alguna de las regiones (Quinto et al., 1985; Romero et al., 1988). Por lo tanto la reiteración de las regiones nif forma un sistema natural de complementación ya que mutaciones en una región serían complementadas por la copia silvestre en otra región.

Debido a esto no es posible aislar al azar mutantes en los genes nif ya que los fenotipos de las mutantes no serían observables fácilmente, por lo tanto el enfoque que se siguió fué hacer una mutagenesis in vitro de las regiones para posteriormente

reintroducir las mutaciones construidas al fondo genético original de R. phaseoli por conjugación y recombinación.

En la actualidad no se ha reportado ningún sistema de transformación eficiente en Rhizobium, por esto es necesario reintroducir las mutaciones a su fondo genético original por conjugación. Hemos escogido el sistema de plásmidos suicidas para este fin (Simon et al., 1983). Este sistema se basa en el uso de vehículos derivados del plásmido pBR 325 que llevan clonada la región mob del plásmido RP4. Esta región le permite ser movilizado en trans por plásmidos que tengan el operón Tra del RP4. Sin embargo los orígenes de replicación de los derivados de ColE1 como son los pBR no son funcionales en R. phaseoli, por lo tanto las transconjugantes solo estabilizan al vector intermediario de mutagenesis si este recombina con regiones homologas en el genoma de la cepa receptora. Asimismo se pueden obtener transconjugantes donde ocurrió un fenómeno de doble recombinación entre la región homologa silvestre y la región en el vector. Usando este sistema es posible entonces introducir las mutaciones construidas al fondo genético receptor y seleccionar aquellas que lleven la mutación en su sitio en el genoma.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

Las cepas bacterianas y plasmidos utilizados y construidos en este trabajo estan descritos en la tabla 1.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

El medio de cultivo utilizado para crecer R. phaseoli fue PY (peptona de caseina 0.5%, extracto de levadura 0.3% y CaCl₂ 7mM) (Noel et al., 1984). El medio utilizado para crecer E. coli fue LB (peptona de caseina 1%, NaCl 1% y extracto de levadura 0.5%) (Miller, 1972). Para solidificar los medios se utilizó agar al 1.5%.

Cuando se requirió se utilizaron los siguientes antibioticos:

Espectinomicina (Sp) 100 µg/ml, Kanamicina (Km) 30 µg/ml, Cloramfenicol (Cm) 15 µg/ml y ácido nalidixico (Nal) 10 µg/ml. Tetraciclina (Tc) fue usada a concentraciones de 2 y de 4 µg/ml para R. phaseoli y a 10 µg/ml para E. coli.

La temperatura de crecimiento de R. phaseoli fue de 30°C y la de E. coli de 37°C. Los cultivos en medio liquido se agitaron a 200 rpm durante 24 hrs. Los cultivos en medio solido se incubaron hasta obtener colonias aisladas (16hrs para E. coli y tres días para R. phaseoli).

CRUZAS BACTERIANAS.

Las conjugaciones bacterianas se realizaron sobre PY solido, incubando 16 hrs a 30°C, las células fueron cosechadas con 3ml de MgSO₄ 10mM Tween 40 0.01% y plateadas en el medio selectivo. Se usó ácido nalidixico 10 µg/ml para contra seleccionar las E.coli donadora y ayudadora.

EXTRACCION DE DNA TOTAL DE R. phaseoli.

Rhizobium phaseoli fue crecido en cultivos de 3 ml de PY hasta saturación. Las células fueron cosechadas, lavadas con Tris 50mM EDTA 20 mM (TE 50-20) y resuspendidas en 0.4ml de TE 50-20. Se agregaron 50 µl de una solución de pronasa 5mg/ml en TE 50-20 predigerida 90' a 37°C y 50 µl de SDS al 10% dejándose incubar una hora a 37°C. El DNA fue fragmentado pasando el lisado tres veces por una aguja insulínica. El lisado fue extraído tres veces con 500 µl de fenol-cloroformo-isoamilico (24|24|1) (FCI) y dos con 500 µl de cloroformo-isoamilico (24|1) (CI). Los ácidos nucleicos fueron precipitados con etanol absoluto (2 1/2 vols y 1/25 vol NaCl 5M) a -20°C, lavados con etanol al 70% y finalmente el etanol fué evaporado. Las pastillas de ácidos nucleicos fueron siempre resuspendidas en agua esteril.

PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDOS RECOMBINANTES.

Los plasmidos recombinantes fueron purificados según una modificación del método de Birnboim y Doly (1979) en la cual se eliminan todos los tiempos de incubación.

DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Los DNAs purificados fueron digeridos siguiendo las indicaciones y cocteles de reacción recomendados por los proveedores (Amer-sham Int. y Promega Biotech).

ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.

Las electroforesis fueron realizadas en geles de agarosa al 1% o al 1.5% de 3mm de grosor y 15 cm de largo con buffer Tris Acetatos EDTA (TAE, Maniatis et al., 1982). Los geles fueron corridos de 12 a 16 horas a 4°C a 40V. Para su visualización fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) e iluminados con luz ultravioleta.

HIBRIDIZACION DNA-DNA TIPO SOUTHERN.

Los geles por transferirse fueron tratados de la siguiente manera: se incubaron con agitación a 4°C en 0.25N HCl dos veces de 15' cada una, para depurar el DNA rompiendo así los fragmentos de alto peso molecular; se siguieron incubando con NaOH 0.5N NaCl 1.5M, dos veces de 15' cada una a 4°C con agitación, para desnaturalizar las cadenas de DNA y finalmente con Tris-HCl 0.5M NaCl 1.5M pH 7.2 para neutralizar por dos veces de 30' cada una. Las membranas de nitrocelulosa o de nylon fueron hervidas 10' en agua esteril para desengrasarlas y fueron mojadas en SSC 6X (Maniatis et al., 1982). Se colocó una membrana de cada lado del gel tratado (transferencia en "sandwich") cubierta por una hoja de papel Whatman y una pila de 5cm aprox de papel absorbente. En-

cima de todo esto se colocó un vidrio con un peso de 0.5Kg aprox. Las transferencias se dejaron 12 horas, el DNA fué fijado a las membranas de nitrocelulosa horneandolas al vacio a 80°C y a las membranas de nilon por irradiación con luz ultravioleta por espacio de 5'.

Los filtros fueron prehibridizados en bolsas de plastico selladas con 10ml de una solución que contenía: solución Denhardt 10x, SSC 5x, buffer fosfatos 0.1m pH 6.8 y DNA de timo de ternera o de esperma de salmón desnaturalizado por calor a una concentración de 50µg/ml . Los filtros fueron prehibridizados a 65°C por 2Hrs.

Los detectores fueron marcados radiactivamente por el método de "Nick Translation" incorporando ^{32}P dCTP en la reacción (Rigby et al, 1977).

Para las hibridizaciones se cambió la solución de prehibridización por 5ml de solución fresca que además contenía el probador radiactivo. Las hibridizaciones se dejaron de 10 a 16 horas a 65°C.

Para quitar la marca no hibridizada los filtros fueron lavados con una solución de SSC 2x SDS 0.1% a temperatura ambiente por dos veces de 15' cada una. Tres veces con una solución de SSC 0.1x SDS 0.1% a 50°C por 20' y dos veces 15' con una solución de SSC 0.1x a la misma temperatura. Los filtros fueron secados a 65°C por 15' antes de ser montados para autoradiografía.

DETECTORES ESPECIFICOS

Se utilizaron los siguientes fragmentos como detectores

especificos para las hibridizaciones: como detector especifico para nifH se utilizó un fragmento SalI de 240 pares de bases que cubre del codón 28 al 110 del marco de lectura de nifHa (Quinto et al., 1985) ; como detector especifico para nifD y nifK se utilizó el inserto Hind III-BamHI del pLS 150; como detector especifico para Km se utilizó el fragmento interno Hind III de Tn5 clonado en pSUP 205 (Quinto et al., 1985) y como detector especifico para Sp se usó el fragmento EcoRI Ω del pHP45 Ω (Prentki y Krisch, 1984).

DETERMINACION DE LA NODULACION Y DE LA FIJACION DE NITROGENO.

Para los ensayos de nodulación con las distintas derivadas de Rhizobium phaseoli se utilizaron semillas de frijol (Phaseolus vulgaris L.) cv. negro Jamapa. Las semillas fueron lavadas con etanol absoluto, esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 15' y enjuagadas con agua estéril. Las semillas fueron puestas a germinar en condiciones estériles en agar agua al 0.7% a 30°C en obscuridad por 48 hrs. Posteriormente se pasaron a matraces Erlenmeyer de 250ml que contenian 200ml de solución nutritiva Fahreus sin nitrógeno (Wacek y Brill, 1976) y fueron inoculados con un cultivo saturado de R. phaseoli en PY. Las plantas inoculadas fueron dejadas dos días mas a 26°C en oscuridad para etiolarlas y despues fueron incubadas con periodos de luz-oscuridad de 12hrs a 26°C. La actividad enzimática de nitrogenasa fue determinada en nodulos aderidos a la raiz en un ensayo de reducción de acetileno. A los

14 o 16 días después de la inoculación, las raíces se cortaron y se introdujeron en frascos de 25ml con tapón hermetico de hule; se les inyectó 1ml de Acetileno y se dejó correr la reacción por 1 hora a temperatura ambiente; la producción de etileno fue determinada por cromatografía de gases.

PURIFICACION DE BACTERIAS DE NODULOS.

Para corroborar que los nódulos habían sido formados por la cepa con la que se había inoculado se cortaron 5 nódulos de cada planta, se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 5' y se lavaron con agua esteril; los nodulos fueron molidos con una pinza esteril y fueron estriados en cajas de PY sin antibioticos. Posteriormente se probaron los marcadores de las colonias obtenidas parchando 50 colonias por planta en medios selectivos para los marcadores de la cepa usada como inculo.

RESULTADOS

CONSTRUCCION DE LOS VEHICULOS INTERMEDIARIOS DE MUTAGENESIS.

El objetivo de este trabajo es estudiar cual es la organización transcripcional de las regiones nif de R. phaseoli. Con este fin se usó un enfoque de mutagenesis dirigida para contruir las cepas necesarias para llevar a cabo este análisis.

Ya que no existe un sistema de transformación eficiente en R. phaseoli es necesario construir las mutaciones en un plasmido que pueda ser movilizado o conjugado para poder reintroducirlo a su fondo genético original. Un plasmido que cumple con estas condiciones es el pSUP 205, un derivado del pBR325 que lleva la región mob del plasmido de amplio rango RP4, la cual le confiere la capacidad de ser movilizada de una cepa a otra utilizando un plasmido ayudador que complemente las funciones de transferencia necesarias para la conjugación (Simon et al., 1983).

Para obtener cepas que llevaran mutaciones en el gene nifH ya sea de la región nif a o b se construyó el vehiculo intermediario de mutagenesis pLS 151 (Soberón-Chávez et al., 1986). Este plasmido fué construido a partir del plasmido pEM 15, un derivado de pSUP 205 que lleva un fragmento EcoRI de 4.9 Kb que comprende la mayor parte de la región nif a, en particular lleva nifH y nifD completos (Morett et al., Aceptado). El pLS 151 fué construido insertando en el sitio de BglII localizado en el gene nifH de la

región nif a un fragmento BamHI de 3.5 Kb, que confiere resistencia a espectinomocina, proveniente del plasmido pGV 764 (Leemans et al., 1982) (ver Fig. 2).

Para obtener mutaciones en nifK se construyó primero el pLS 150, un derivado de pSUP 205 que lleva un inserto HindIII-BamHI de 3Kb del plasmido pB9 cubriendo parte de nifD y nifK completo de la región nif a (ver Fig. 1). Posteriormente se hicieron digestiones parciales del pLS 150 con EcoRI para insertar en el sitio de EcoRI que se encuentra dentro de nifK un interposón Ω que también confiere resistencia a espectinomocina (ver fig. 3).

CONSTRUCCION DE CEPAS MUTANTES.

Las mutaciones construidas en los plasmidos pLS 151 y pLS 171 fueron introducidas a R. phaseoli en cruzas triparentales usando como ayudador al plasmido pRK 2013 (Guiney et al., 1979). Este plasmido es un derivado del plasmido ColE1 que lleva el operón Tra del plasmido RP4, el pRK 2013 es capaz de movilizar a todos los elementos genéticos que lleven el sitio de origen de la conjugación del RP4, el sitio mob, por complementación en trans de las funciones de conjugación. El pRK 2013 es incompatible con todos los derivados del pBR por tener un origen de replicación común proveniente del ColE1 (Guiney et al., 1979). Si la cepa huesped es Rec⁻, los plasmidos se transferirán independientemente el uno del otro, no como cointegrados.

Al no ser funcionales estos orígenes de replicación en Rhizobium,

las transconjugantes solo adquieren los marcadores del vector intermediario cuando este recombina con regiones homologas en el genoma de la receptora. Asimismo es posible obtener transconjugantes en las cuales ocurre un fenómeno de doble recombinación entre la región silvestre y la región mutada, quedando la mutación construida insertada en su sitio en el genoma.

En este trabajo se usaron las cepas CE 3 (silvestre) y CFN 2201 (nifHa::Km) como receptoras en las cruzas. La cepa CE 3 fué usada para construir cepas que llevaran inserciones sencillas en nifH o nifK de las regiones nif a o b. La CFN 2201 fué utilizada para obtener derivadas que llevaran mutaciones en las regiones nif a y b a la vez.

Las transconjugantes fueron seleccionadas en medio PY con Nal, Sp y Km cuando era necesario. El ácido nalidixico fué empleado para contraseleccionar a las cepas donadora y ayudadora. La frecuencia de aparición de transconjugantes fue en todos los casos alrededor de 10^{-5} transconjugantes por receptora (ver tabla 2). Para seleccionar las dobles recombinantes en las cruzas con el pLS 151 se verificaron los marcadores de resistencia a Tc de las transconjugantes Nal^r Sp^r y en las cruzas con el pLS 171 se verificaron los marcadores de resistencia a Cm. Como control se realizaron cruzas con la cepa silvestre CE 3 usando el vehiculo intermediario de mutagenesis pJL 115 (Quinto et al., 1985), este vehiculo lleva una inserción de un determinante de resistencia a Kanamicina insertado en el gene nifH de la región nif a. Los

resultados aparecen en la tabla 2.

Se aislaron derivadas en cada cruce que llevaran los marcadores indicativos de que habia ocurrido una doble recombinación. Estas fueron purificadas resuspendiendo las colonias en $MgSO_4$ 10 mM Tween 40 0.01n% y plateandose despues a alta dilución. Se volvieron a probar los marcadores de estas cepas tanto en caja como en liquido.

En el caso de la cruce con pJL 115 con la CE 3 se seleccionaron 6 derivadas Nal^r , Km^r , Tc^r (dobles recombinantes) y dos derivadas Nal^r , Km^r , Tc^r (recombinantes sencillas).

Para la cruce empleando el pLS 151 con la CE 3 se aislaron 4 derivadas Nal^r , Sp^r , Tc^r y 4 derivadas Nal^r , Sp^r , Km^r , Tc^r en la cruce con la CFN 2201.

Usando el pLS 171, con la cepa CE 3 se escogieron 8 derivadas Nal^r , Sp^r y Cm^r y con la CFN 2201 ocho derivadas Nal^r , Km^r , Sp^r y Cm^r .

El análisis de las hibridizaciones de estas cepas con un detector especifico de nifH mostró que pese a tener los marcadores correctos algunas de las cepas mostraban rearrreglos o deleciones (por ejemplo carriles 1 y 2 de la fig 4) o eran cointegrados del vector intermediario aunque no expresaran las resistencias del vehiculo. De este análisis se escogieron para un mayor estudio cepas que presentaban el perfil esperado para las siguientes derivadas: nifHa::Sp, nifKa:: Ω , nifKb:: Ω , nifHa::Km nifKb:: Ω y se les denominó CFN 2220, CFN 2221, CFN 2222, CFN 2223 respec-

tivamente (carriles 3,5,6 y 8 de la figura 4). Asimismo se escogieron dos derivadas más que llevaban ambas una inserción en la región nif b aunque de mucho mayor tamaño que la esperada, los perfiles de estas cepas serían nifHb::Sp y nifHa::Km nifHb::Sp (carriles 2 y 9 de la Fig 4) denominadas CFN 2224 Y CFN 2225. También se escogió una derivada que presentaba una banda del peso esperado para una inserción nifHa::Sp pero que había perdido las bandas correspondientes a las regiones nif b y c denominada CFN 2226.

Para confirmar el sitio de inserción de las mutaciones se hicieron hibridizaciones con detectores específicos para nifH, Km y Sp.

La cepa CE 3 presenta en BamH1 tres bandas de hibridización con nifH de 9, 5.6 y 4 Kb correspondientes a las regiones nif a, b y c respectivamente (carril 4 fig 4), ninguna de ellas tiene homología con Km ni con Sp (carril 4 figs 5 y 6).

La cepa CFN 2201 tiene en BamH1 tres bandas de hibridización con nifH de 11.1, 5.6 y 4 Kb de las cuales solo la primera, correspondiente a nifHa::Km, hibridiza con Km; ninguna es homóloga a Sp (carril 7 figs 4, 5 y 6).

La derivada CFN 2220 presenta tres bandas de hibridización con nifH de 12.5, 5.6 y 4 Kb de las cuales la primera también hibridiza con Sp. Ninguna hibridiza con Km. El patrón de esta cepa indica que en efecto se trata de una derivada que lleva una inserción en la región nif a y que mantiene las regiones b y c

intactas (carril 3 figs 4, 5 y 6)

La derivada CFN 2221 tiene tres bandas de hibridización con nifH de 8, 5.6 y 4 Kb, no tiene zonas de homología con Km y solo tiene una banda de 2Kb, correspondiente al interposón Ω , homologa a Sp. Este patrón es el esperado para cepas que llevan inserciones en nifK de la región a ya que la inserción del interposón Ω , el cual esta flanqueado por dos sitios BamHI (ver Fig 1), provoca la disminución en tamaño de la banda silvestre (carril 5 figs 4, 5 y 6).

Asimismo la derivada CFN 2222 tiene tres bandas de homología con nifH de 9, 4.2 y 4 Kb, tampoco tiene homología con Km y muestra solo una banda de 2Kb homologa a Sp. El patrón que tiene esta cepa es el esperado para una inserción en nifK de la región nif b ya que la presencia del interposón Ω tambien provoca una disminución en el tamaño de la banda correspondiente a la región nif b (carril 6 figs 4, 5 y 6).

La derivada CFN 2223 tiene tres bandas de homología con nifH de 11.5, 4.2 y 4 Kb de las cuales solo la primera hibridiza con Km; tambien tiene una banda de 2Kb homologa a Sp. Su patrón corresponde al de una cepa que lleva una inserción de un interposón Km^r en la región nif a y el tamaño de la banda correspondiente a la región nif b indica que lleva una inserción del interposón Ω en nifK (carril 8 figs 4, 5 y 6).

El análisis de estas derivadas tambien incluyó a las cepas que llevaban inserciones en la región nif b ya que el patrón indicaba

que las inserciones no eran recombinantes sencillas. Ambas cepas presentan tres bandas de hibridización con nifH; en la CFN 2225 pesan 11.5, 4 y una mayor a 18 Kb, de las cuales solo la de 11.5 hibridiza con Km y solo la mayor a 18 Kb con Sp (carril 9 figs 4, 5 y 6); en la CFN 2224 las bandas pesan 9,4 y también una mayor a 18 Kb, la cual es la única con homología con Sp. No hay zonas de homología con Km (carril 2 figs 4, 5 y 6). Los patrones de hibridización de ambas derivadas indica que las inserciones se limitan a la zona nif b y que las otras regiones nif fueron respetadas.

La derivada CFN 2226 que perdió las regiones nif b y c solo presenta una banda de hibridización con nifH de 12.5 Kb la cual también es homóloga a Km. Esta cepa no tiene zonas homólogas al detector Sp (carril 1 figs 4, 5 y 6).

Para localizar con mayor precisión el sitio de inserción en las regiones nif b de las cepas CFN 2224 y CFN 2225 se digirió DNA de cada cepa con Sall y se hicieron hibridizaciones contra detectores específicos para nifD y nifK y para nifH. Sall tiene múltiples sitios de corte en las regiones nif a y b por lo que permite identificar el fragmento donde está la inserción. El detector específico de nifH revela en ambas cepas un solo fragmento correspondiente al extremo 5' interno de nifH; el detector nifDK revela en la CFN 2225 el mismo patrón que en la cepa silvestre CE 3 y en la CFN 2224 una banda más, también homóloga a pSUP 205. Los patrones obtenidos en estas hibridizaciones indican que las

inserciones mapean dentro del gene nifH (Fig. 7)

ANALISIS DE LOS PATRONES DE PLASMIDOS.

El patrón de plasmidos fue analizado siguiendo la tecnica de Eckhardt (1978)(ver Fig 8). Para identificar el plasmido Sim en cada derivada los geles fueron transferidos y hibridizados con un detector especifico para nifH. El patrón revelado en la hibridización muestra que a excepción de la cepa CFN 2226, que ya no tiene las regiones nif b y c, todas las derivadas presentan una banda de hibridización del mismo tamaño que la CE 3 o la CFN 2201. La CFN 2226 tiene una banda de menor peso molecular lo cual indica que lleva una deleción (fig 8).

ANALISIS DE LOS FENOTIPOS SIMBIOTICOS DE LAS DERIVADAS.

Se inocularon raices de Phaseolus vulgaris L. cv. Negro Jamapa con las cepas obtenidass para determinar sus fenotipos de nodulación y de Fijación de nitrógeno (Nod y Fix).

Se inocularon a los dos dias de germinar 6 plantas de frijol por cepa con 0.5 ml de un cultivo saturado de la bacteria. A los 13 o 16 días despues de haber sido inoculadas se cortaron las raices y se determino la actividad de nitrogenasa por el ensayo de reducción de acetileno.

Fenotipo de los nódulos producidos por las mutantes.

Todas las cepas produjeron un número de nódulos por planta muy

similar (20 ± 10) a excepción de la CFN 2226 que no nodula. Esto indica que las mutaciones en los genes estructurales de la nitrogenasa no afectan el proceso de infección de la planta por las bacterias. Las cepas que llevan alguna de las regiones nif a o b libres de inserciones producen nódulos de color rosa, en los cuales se pueden observar los haces de vascularización (CFN 2220, CFN 2221, CFN 2222, CFN 2224, CFN 2201). Las cepas que llevan inserciones en ambas regiones nif a y b producen nódulos de menor tamaño, lisos y de color verde-blanco, esto es un marcador característico del fenotipo Fix^- (CFN 2223 y CFN 2225) (Hirsh y Smith, 1987).

Fenotipo de fijación de nitrógeno.

Las cepas CFN 2220, CFN 2221, CFN 2222 y CFN 2224, que tenían ya sea la región nif a o b libre de inserciones, tuvieron todas un fenotipo Fix^+ al tener una actividad de reducción de acetileno comparable a la cepa silvestre CE 3. Las cepas CFN 2223 y CFN 2225 que llevan inserciones en ambas regiones tienen ambas un fenotipo Fix^- .

Se checó que las bacterias contenidas en los nodulos hayan mantenido los marcadores de resistencia de la clona del inoculo. Se extrajeron bacterias de tres nódulos de cada planta inoculada. El 100% de las colonias probadas mantuvieron el fenotipo de resistencia a antibióticos (200 por cepa). Además, se checó que las bacterias recuperadas de los nodulos hayan mantenido su patrón de hibridización contra nifH en BamH1.

DISCUSION

En este trabajo se describe la construcción de derivadas de Rhizobium phaseoli que llevan mutaciones en los genes estructurales de la nitrogenasa. El análisis de los fenotipos simbióticos de las distintas derivadas permite estudiar los posibles arreglos transcripcionales de las regiones nif a y b.

El análisis de las regiones nif en hibridizaciones tipo Southern contra detectores heterologos de Parasponia Rhizobium específicos para nifD y nifK mostró que solo en las regiones nif a y b existen secuencias homologas a estos genes (C. Quinto, no publicado). Por ende, en R. phaseoli, los genes estructurales de la nitrogenasa estan agrupados en las regiones nif a y b.

Las cepas CFN 2220, CFN 2221 y CFN 2222 llevan inserciones en nifHa o en alguno de los genes nifK manteniendo la otra libre de inserciones. Estas cepas tienen un fenotipo Fix⁺ que en nuestras condiciones es indistinguible del de la cepa silvestre. Sin embargo Romero et al.(1988) demostraron que ambas regiones nif a y b son necesarias para tener una maxima efectividad simbiótica, ya que derivadas que llevaban mutaciones en nifHa o en nifHb tenían una efectividad simbiótica menor que la cepa silvestre padre, en cuanto a actividad total de nitrogenasa por planta, actividad

especifica de nitrogenasa y nitrógeno total en la planta. Es de suponerse que las cepas CFN 2220, CFN 2221 Y CFN 2222 compartan también estas características al comparar sus capacidades simbióticas en condiciones óptimas de crecimiento de la planta donde la única limitante sea la fijación de nitrógeno.

La cepa CFN 2224 lleva una inserción en la región nif b, el análisis de los patrones de hibridación revelados por un detector específico para nifK y nifD muestran la aparición de una banda que también tiene homología con pSUP 205. Al igual que en la CFN 2225, la inserción en la región nifb parece estar localizada en nifH. Su comportamiento simbiótico es similar al de todas las cepas que llevan inserciones sencillas.

En la cepa CFN 2223 las mutaciones construidas mapean en las regiones nif a y b. La región nif a está interrumpida en nifH por una inserción de un determinante de resistencia a kanamicina y la región nif b está interrumpida en la zona homóloga a nifK por la inserción de un interposón Ω , el cual confiere resistencia a espectinomicina. En esta cepa no se observa complementación de la inserción en nifHa por el gene nifHb en la región que lleva la inserción en la zona homóloga a nifK ya que tiene un fenotipo Fix^- , este sería debido a la carencia de los productos de los genes nifK, en un caso por la inserción en la zona homóloga a este gene y en el otro por la polaridad de la inserción en el

gene nifH sobre la expresión de nifK. Por lo tanto se concluye que en la región nif a, los genes nifH, nifD y nifK forman un operón.

En la cepa CFN 2225 las inserciones también mapean en las regiones nif a y b. El análisis de las hibridizaciones con un detector específico para nifD y nifK muestra que esta cepa tiene el mismo patrón que la cepa silvestre CE 3 y que la cepa padre CFN 2201, esto indica que las inserciones no involucran a los genes nifD y nifK; asimismo esta cepa solo muestra una banda de hibridización en Sali con el detector específico de nifH empleado (este fragmento revelado es externo al fragmento en donde mapea la inserción). Por lo tanto las hibridizaciones muestran que la zona alrededor de la inserción están intactas. Por ende la inserción está localizada en el gene nifH de la región nif b o en la región 5' del gene nifH. La región nif a está interrumpida del mismo modo que en la CFN 2223 por lo tanto la inserción en nifHa es polar sobre la expresión de nifDK. En esta cepa no se observa complementación del efecto de polaridad de la mutación en nifHa sobre nifDKa por los genes nifD y nifK de la región nif b. El fenotipo Fix⁻ observado sería entonces debido a la ausencia de los productos de nifD y nifK en ambos casos por polaridad de las inserciones en nifH sobre la expresión de nifDK en ambas regiones nif, por lo tanto los genes nifHDK también forman un operón en la región nif b.

El análisis de la cepa CFN 2226 muestra que lleva una delección

del plasmido simbiótico ya que se observa una banda de menor peso molecular en esa cepa; las hibridaciones con un detector específico para nifH indican además que se perdieron las regiones nif b y c, las hibridaciones con un detector específico para nifD y nifK muestran que la región está incompleta (datos no mostrados). El fenotipo Nod⁻ de esta no es debido a la inserción en nifH sino a la pérdida de genes de nodulación.

La expresión del gene nifH de la región nif c no ha podido ser claramente demostrada ya que cepas que llevan fusiones nifH-lacZ tienen rearrreglos a alta frecuencia de esta zona (Morett et al., 1988). Por lo tanto es necesario construir cepas que lleven este tipo de fusiones estabilizadas, por ejemplo como cointegrado del vector intermediario para construir esta fusión con plasmidos que si son estables en Rhizobium como el pNC 206, donde se puede medir la expresión de la fusión lacZ. Se puede sino buscar la complementación de cepas de Rhizobium o de Klebsiella pneumoniae que lleven mutaciones no polares en nifH con plasmidos que lleven la región nif c. Sin embargo cepas que llevan una sustitución-delección en la región nif c fijan nitrógeno en simbiosis lo cual indica que esta región no es indispensable para la fijación de nitrógeno (C. Quinto et al., 1985).

Los nódulos inducidos por las cepas inefectivas son más pequeños y tal vez más numerosos que los nódulos inducidos por una cepa

efectiva, son de color verde-blanco lo cual indica la ausencia de leghemoglobina y los haces vasculares en la superficie del nódulo parecen estar menos desarrollados. El análisis microscópico de cortes de nódulos inducidos por una cepa inefectiva por llevar mutaciones en las regiones nif a y b, la CFN 2210 (Romero et al., 1988), mostró la presencia de bacteroides en el tejido de la planta lo que indica que el desarrollo del nódulo se detiene al momento de empezar a fijar nitrógeno; también se observó la proliferación de amiloplastos en las células no infectadas (F. Sanchez, comunicación personal), esto es característico de nódulos inducidos por cepas inefectivas (P. Hirsh et al. 1987).

En conclusión en Rhizobium phaseoli los genes estructurales de la nitrogenasa en las regiones nif a y b están organizados en dos operones nifHDK, la región nif c, en caso de expresarse, formaría una unidad independiente de expresión.

La organización de los genes nifHDK como operón es característica de los rhizobia de crecimiento rápido ya que se ha encontrado en todos los sistemas donde se ha buscado (por ejemplo Rhizobium meliloti, Rhizobium leguminosarum, Rhizobium trifolii) (Ruvkun et al., 1982; Corbin et al., 1982; Ma et al., 1982; Scott et al., 1983b). La reiteración de los genes de la nitrogenasa ha sido observada en otros Rhizobia como es el caso de Rhizobium fredii o de Rhizobium sp. NGR234, en estos sistemas los genes nifHDK también forman operones (Prakash & Atherly, 1984). En R. fredii

Mathis et al.(1985) observaron que mutaciones en genes nif provocan una disminución en la actividad de fijación de nitrógeno, esto indica que, al igual que en Rhizobium phaseoli (Romero et al., 1988), las distintas copias participan en la función global.

REFERENCIAS.

- Beynon J., Cannon M., Buchanan-Wollaston V. & Cannon F. 1983. The nif promoters of Klebsiella pneumoniae have a characteristic primary structure. Cell 34:665-674
- Birnboim H. & Doly L. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Ac. Res. 7:1513-1523
- Buck M. Miller S. & Dixon R. 1986. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. Nature 320:374-378
- Corbin D., Ditta G. & Helinski D. 1982. Clustering of nitrogen fixation (nif) genes in Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 149: 221-228
- Eckhardt T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1:584-588
- Elmerich C., Haumard J., Sibold L., Manheimer I. & Charpin N. 1978. Genetic and biochemical analysis of mutants induced by bacteriophage μ integration into Klebsiella pneumoniae nitrogen fixation genes. M.G.G. 165: 181-189
- Flores M., Gonzalez V., Brom S., Martinez E., Piñero D., Romero D., Dávila G & Palacios R. 1987. Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium spp. J. Bacteriol. 169:5782-5788
- Guiney DG. & Helinski DR. 1979. Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. J. Bacteriol. 117:619-630
- Hirsch AM. & Smith CA. 1987. Effects of Rhizobium meliloti nif and fix mutants on alfalfa root nodule development. J. Bacteriol. 169: 1137-1146
- Ma Q., Johnston AWM., Hombrecher G. & Downie JA. 1982. Molecular genetics of mutants of Rhizobium leguminosarum which fail to fix nitrogen. M.G.G. 187:166-171
- Mac Neil T., Mac Neil D., Roberts GP., Supiano MA. & Brill WJ. 1978. Fine Structure and Complementation Analysis of nif (nitrogen fixation) genes in Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol. 136: 253-266
- Maniatis T., EF. Fritsch and J. Sambrook. 1982. "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Martínez E., Pardo MA., Palacios R. & Cevallos MA. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. Gen. Microbiol. 131: 1774-1786

Martínez E., D. Romero and R. Palacios. 1988. The Rhizobium genome. Aceptado para publicación CRC Critical Reviews in Plant Sciences.

Mathis JN, Barbour Wm and Elkan GH. 1985. Effect of Sym plasmid curing on symbiotic effectiveness in Rhizobium fredii. Appl. Environ. Microbiol. 49:1385-1389

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

Miller JM. 1972. " Experiments in Molecular genetics" Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Morett E., Moreno S. & Espin G. 1988. Analysis of the three nifH genes of Rhizobium phaseoli with gene fusions. Aceptado para su publicación en M.G.G.

Noel KD., Sanchez A., Fernandez L., Leemans J. & Cevallos MA. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158:148-155

Norel F. & Elmerich C. 1987. Nucleotide sequence and functional analysis of the two nifH copies of Rhizobium ORS571, J. Gen. Microbiol. 133:1563-1576

Ow DW., Sundaresan V., Rothstein DM., Brown SE. & Ausubel FM. 1983. Promoters regulated by glnG(ntrC) and nifA genes products share a heptameric consensus sequence in the -15 region. Cell 80:2524-2528

Prakash RK. & Atherly AG. 1984. Reiteration of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast growing Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. 160:785-787

Prentki P. & Krisch HM. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene 29: 303-313

Quinto C., de la Vega H., Flores M., Fernandez L., Ballado T., Soberón G. & Palacios R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature 299:724-725

- Quinto C., de la Vega H., Flores M., Leemans J., Cevallos MA., Pardo MA., Azpiroz R., Girard Mdel., Calva E. & Palacios R. 1985. Nitrogenase reductase: a multigene family in Rhizobium phaseoli. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:1170-1174
- Rigby FWJ., Dieckman M., Rhodes C. & Berg P. 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to a high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113:237-251
- Romero D., Singleton PW., Segovia L., Morett E., Ben Bohlool B., Palacios R. & Dávila G. 1988. Effect of naturally occurring nif reiterations on symbiotic effectiveness in Rhizobium phaseoli. App. Environ, Microbiol. 54:848-850
- Ruvkun G. & Ausubel FM. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc Natl. Acad. Sci. (USA) 77:191-195
- Ruvkun G., Sundaresan V. & Ausubel FM. 1982. Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of Rhizobium meliloti symbiotic nitrogen fixation genes. Cell 29: 551-559
- Scott K., Hughes JE., Gresshoff PM., Beringer JE., Rolfe BG. & Shine J. 1982. Molecular cloning of Rhizobium trifolii genes involved in symbiotic nitrogen fixation. J. Mol. Appl. Genet. 1:315-326
- Scott K., Rolfe B. & Shine J. 1983a. Nitrogenase structural genes are unlinked in the non-legume symbiont Parasponia Rhizobium. DNA 2:141-148
- Scott K., Rolfe B. & Shine J. 1983b. Biological nitrogen fixation: primary structure of the Rhizobium trifolii iron protein. DNA 2:149-155
- Simon R., Priefer V. & Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Bio/Technology 1:784-791
- Sóberon-Chávez G., Nájera R., Olivera H. & Segovia L. 1986. Genetic rearrangements of a Rhizobium phaseoli symbiotic plasmid. J. Bacteriol. 167:487-491
- Wacek T. & Brill WJ. 1976. Simple, rapid assay for screening nitrogen fixing ability in Soy-bean. Crop. Sc. 16: 519-522
- Wang CL., Beringer JE. & Hirsh PR. 1986. Host plant effects on hybrids of Rhizobium leguminosarum biovars viceae and trifolii. J. Gen. Microbiol. 132:2063-2070

TABLA 1

| Cepa | Genotipo relevante | Origen |
|---------------------------|--|---------------------|
| <u>E. coli</u> | | |
| HB 101 | F ⁻ , <u>hsdR</u> , <u>hsdM</u> , <u>recA</u> ⁻ , Sm ^r | Maniatis, 1982 |
| <u>Rhizobium phaseoli</u> | | |
| CE 3 | Derivada Sm ^r de la cepa silvestre CFN 42 | Noel et al, 1984 |
| CFN 2201 | Derivada de CE 3, <u>nifHa</u> ::Km | Quinto et al, 1985 |
| Plasmidos | | |
| pRK 2013 | Derivado de ColE1 con la región <u>tra</u> del plasmido RP4 | Guiney et al, 1979 |
| pSUP 205 | Derivado del pBR 325 con el sitio <u>mob</u> del plasmido RP4 | Simon et al, 1983 |
| pEM 15 | Derivado de pSUP 205 con el fragmento EcoR1 de la región <u>nif</u> a de <u>R. phaseoli</u> | Morett et al, 1988 |
| PLS 150 | Derivado de pSUP 205 con un fragmento HindIII-BamHI conteniendo parte de <u>nifD</u> y <u>nifK</u> completo de la región <u>nif</u> a de <u>R. phaseoli</u> | Este trabajo |
| PLS 151 | Vehículo intermediario de mutagenesis derivado del pEM 15 conteniendo una inserción de un cassette de resistencia a espectinomicina en el sitio BglIII de <u>nifHa</u> | Este trabajo |
| PLS 171 | Vehículo intermediario de mutagenesis derivado del PLS 150 conteniendo una inserción del interposón Ω en el sitio EcoR1 de <u>nifKa</u> | Este trabajo |
| PHP45 Ω | Derivado del vector PHP45 que lleva el interposón Ω de 2Kb, que confiere resistencia a espectinomicina | Prentki et al, 1984 |

TABLA 2

| Plasmido | Receptora | Transconjugantes por receptora ^a | % de dobles recombinantes ^b |
|----------|-----------|--|---|
| pJL 115 | CE 3 | 1.3×10^{-5} | 6 % |
| PLS 151 | CE 3 | 1.0×10^{-5} | 4 % |
| PLS 171 | CE 3 | 2.1×10^{-5} | 4 % |
| PLS 151 | CFN 2201 | 0.8×10^{-5} | 2 % |
| PLS 171 | CFN 2201 | 1.3×10^{-5} | 4 % |

a Número de clonas que llevan los marcadores del vehiculo inter-
mediario entre el número de clonas Nal^r.

b Porciento de transconjugantes que no llevan los marcadores de
vector (Tc para pJL 115 y para PLS 151 y Cm para PLS 171)

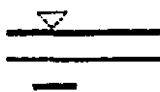

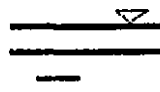
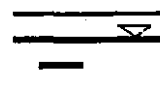
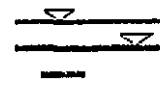
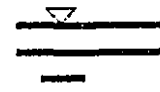
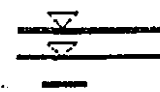
| | | Nod | Fix |
|---|----------|-----|-----|
|  | CE 3 | + | + |
|  | CFN 2201 | + | + |
|  | CFN 2220 | + | + |
|  | CFN 2221 | + | + |
|  | CFN 2222 | + | + |
|  | CFN 2223 | + | - |
|  | CFN 2224 | + | + |
|  | CFN 2225 | + | - |

TABLA 3

Genotipo y Fenotipo Simbiótico de las mutantes construidas.

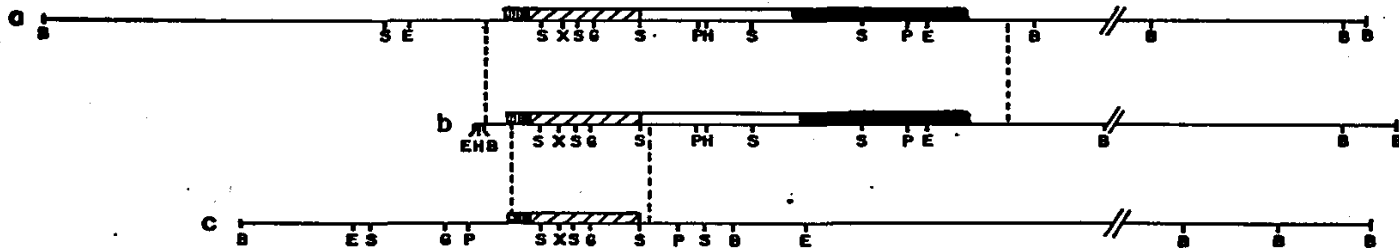





FIGURA 1: Mapa de restricción de las regiones *nif*. Las líneas punteadas denotan los límites de homología entre las regiones.  zona de operación y promoción.  homología con *nifD*.  homología con *nifK*. B, BamH1. S, SalI. G, Bgl II. H, Hind III. P, Pst I. X, Xho I (tomado de Quinto et al, 1985)

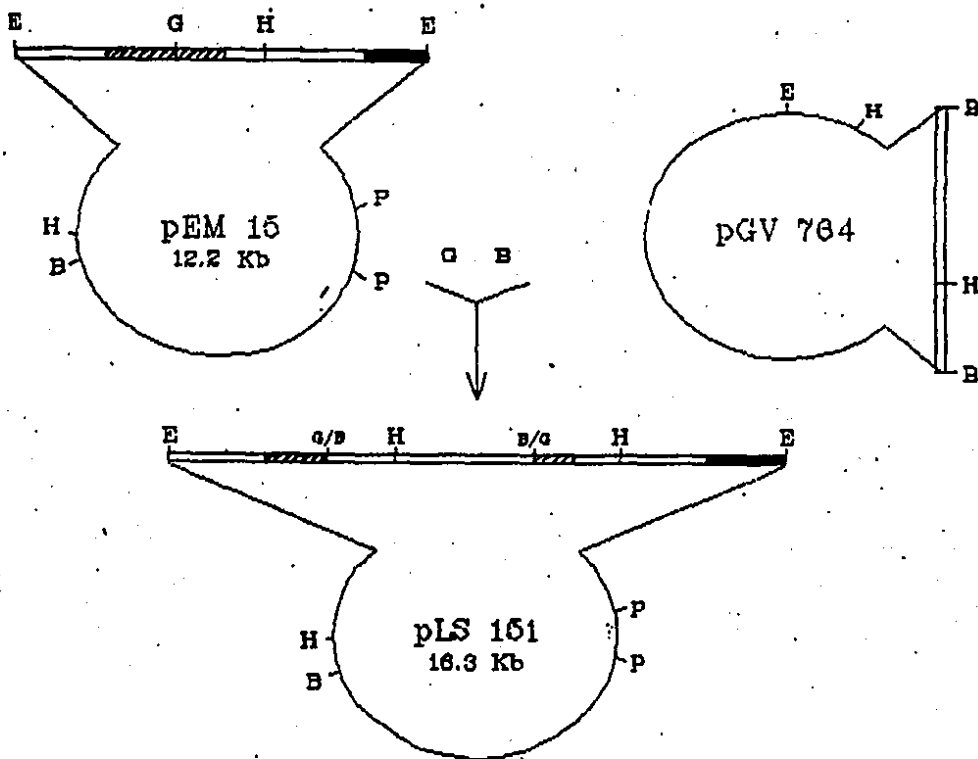


FIGURA 2: Construcción del vector intermediario de mutagenesis pLS151. El plasmido pEM 15 fué digerido con BglII (G) y el plasmido pGV764 con BamHI (B). Los extremos generados por estas digestiones son cohesivos, por lo tanto los fragmentos generados pueden ser ligados. El pLS 151 fué obtenido transformando con la mezcla de ligación y seleccionando para los marcadores del vector (Tc^r, Ap^r, Cm^r) y del cassette (Sp^r).

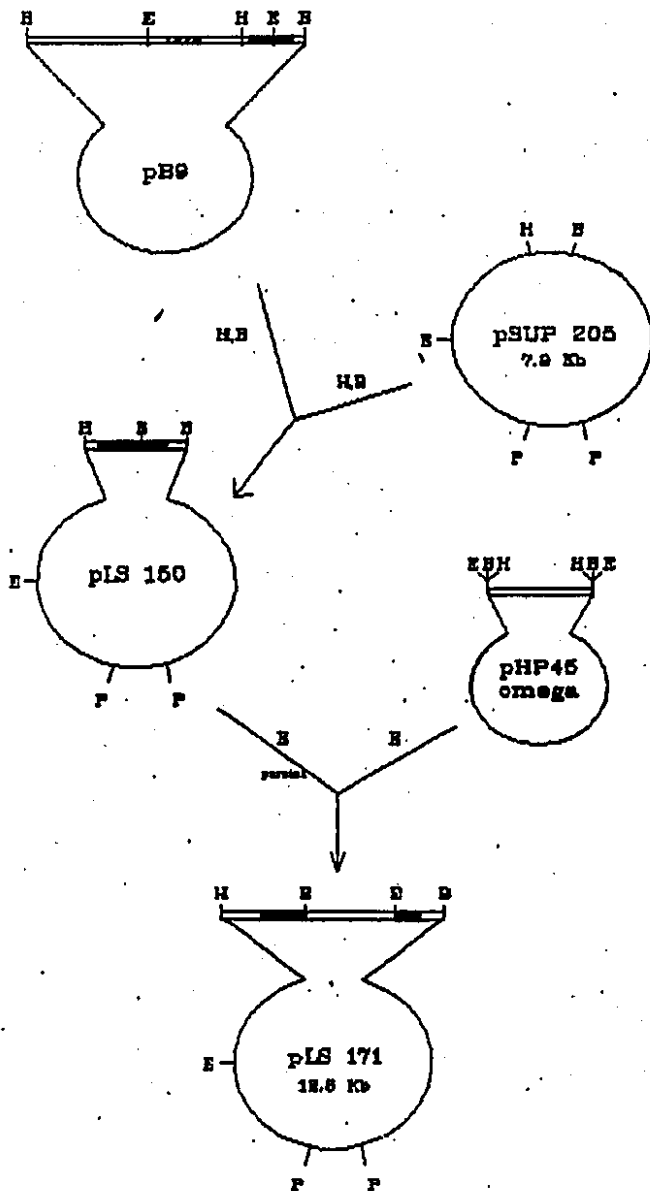


FIGURA 3: Construcción del vector intermediario de mutagenesis pLS171. Los plasmidos pSUP 205 y pB9 fueron digeridos con BamHI (B) y con HindIII (H). El pLS 150 fue obtenido de la transformación con la mezcla de ligación de estas digestiones, seleccionando para los marcadores del pSUP 205 (Cm^r, Ap^r) y la inserción del inserto (Tc^r). El pHP45 Ω fue digerido con EcoRI (E), el pLS150 fue digerido parcialmente con EcoRI y se ligaron las mezclas de digestión. El pLS 171 fue aislado seleccionando para el interposón Ω (Sp^r) y los marcadores del vector (Cm^r).

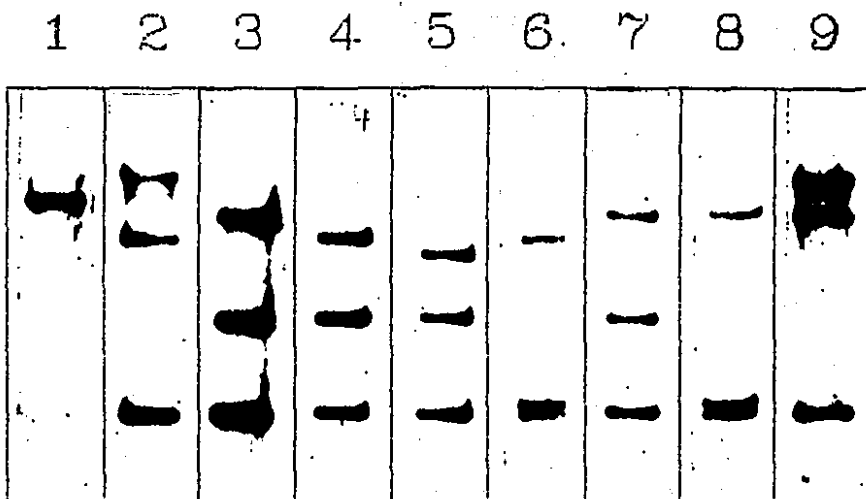


FIGURA 4: Patrones de hibridización de las derivadas.
 Hibridizaciones de DNA total de las mutantes digerido con BamHI
 usando un detector específico para nifH. 1- CFN 2226. 2- CFN 2224
 3- CFN 2220. 4- CE 3. 5- CFN 2221. 6- CFN 2222. 7- CFN 2201.
 8- CFN 2223. 9- CFN 2225.

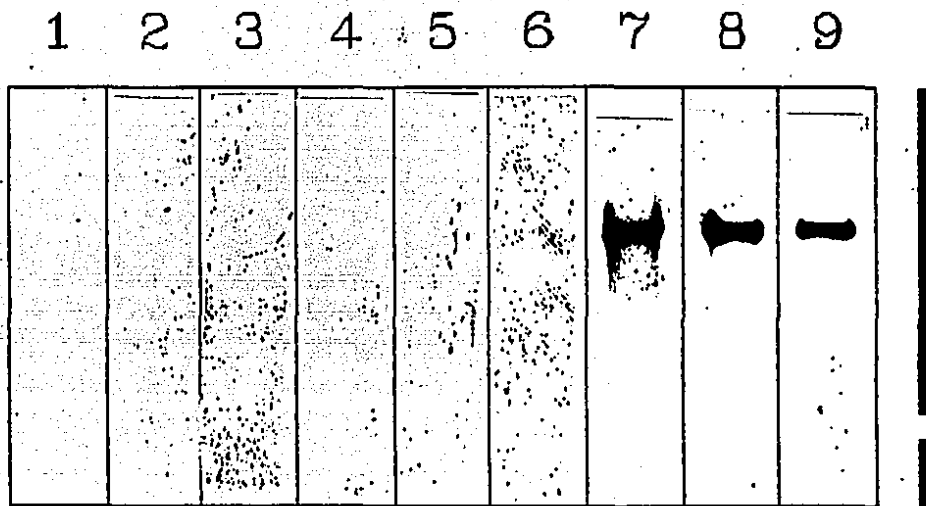


FIGURA 5: Patrones de hibridación de las derivadas.
 Hibridaciones de DNA total de las mutantes digerido con BamHI
 usando un detector específico para Km. 1- CFN 2226. 2- CFN 2224
 3- CFN 2220. 4- CE 3. 5- CFN 2221. 6- CFN 2222. 7- CFN 2201.
 8- CFN 2223. 9- CFN 2225.

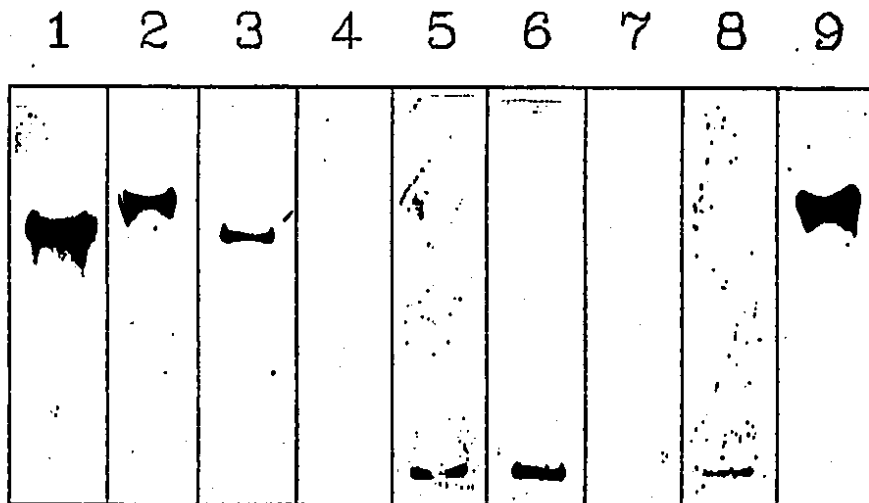
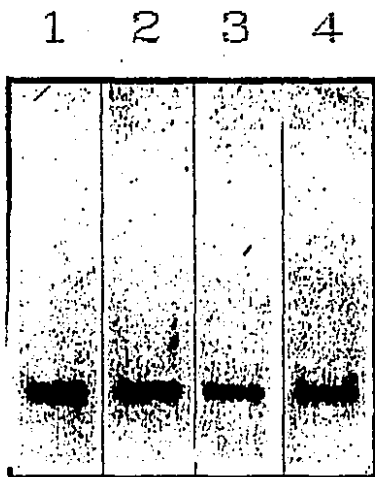
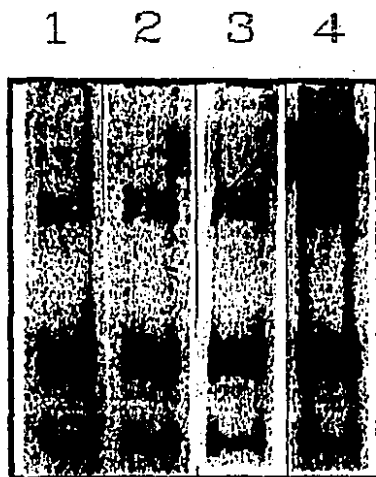


FIGURA 6: Patrones de hibridización de las derivadas.
 Hibridizaciones de DNA total de las mutantes digerido con BamHI
 usando un detector específico para Sp. 1- CFN 2226. 2- CFN 2224
 3- CFN 2220. 4- CE 3. 5- CFN 2221. 6- CFN 2222. 7- CFN 2201.
 8- CFN 2223. 9- CFN 2225.



vs nifH



vs nifDK

FIGURA 7: Patrones de hibridización de las derivadas.
 Hibridizaciones de DNA total de las mutantes digerido con Sali
 usando detectores específicos para nifH y para nifDK. 1- CE 3.
 2- CFN 2201. 3- CFN 2225. 4- CFN 2224.

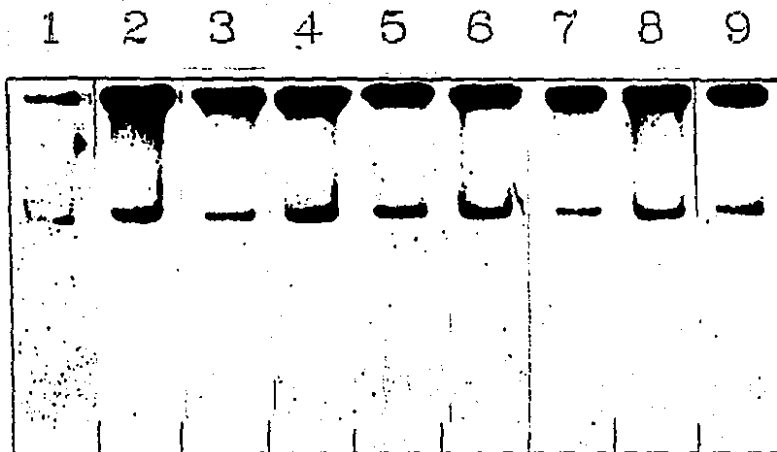


FIGURA 8: Patrones de hibridización de las derivadas.
 Hibridizaciones de los patrones de plasmidos obtenidos por la
 tecnica Eckhardt con un detector específico para nifH.
 1- CFN 2226. 2- CFN 2224 3- CFN 2220. 4- CE 3. 5- CFN 2221.
 6- CFN 2222. 7- CFN 2201. 8- CFN 2223. 9- CFN 2225.