

050
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

REVISION DE ALGUNOS METODOS EMPLEADOS PARA INTENTAR MODIFICAR LA --
INFORMACION GENETICA DE PLANTAS, FACTIBILIDAD DE INTENTARLO CON ANA-
BAENA SP. Y NOSTOC SP., CIANOBACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO RESIS- --
TENTES A ACTINIMICINA - D .

J. JESUS QUIROZ MORA .

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO .

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS 1979.
M.C. ~~285~~ 285
FECHA _____
NRO. _____
S. _____



PRESIDENTE	Profra. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ.
VOCAL	Prof. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN.
SECRETARIO	Profra. MAGADALENA OLIVA GONZALEZ.
1er. SUPLENTE	Profra. MA.DOLORES LASTRA AZPILICUETA.
2o. SUPLENTE	Prof. SERGIO PALACIOS MAYORGA.

Sitio donde se desarrolló el tema:

División de Estudios de Posgrado.Facultad de Química.
Departamento de Bioquímica.

Sustentante:

J.Jesús Quiróz Mora

Asesor del tema:

Dra. Estela Sánchez de Jiménez

A mis padres:

Claudia Mora de Quiróz

Genaro Quiróz Machado

A mis hermanos.



Con cariño a mi esposa Ma.de los Angeles

A mis hijos:

Jesús y Genaro Rodrigo.

CONTENIDO

	Página
CAPITULO 1	
ANTECEDENTES.	1
1.1 Introducción de ADN a tejidos vegetales	3
1.2 Introducción de ADN a protoplastos	7
1.3 Introducción de organelos a protoplastos de plantas	12
1.4 Fusión de células somáticas	16
CAPITULO 2	
OBJETIVO	24
CAPITULO 3	
INTRODUCCION	24
3.1 Resistencia a antibióticos	26
3.2 Mecanismo de acción de la actinomicina-D	29
CAPITULO 4	
IMPORTANCIA DE LA FIJACION DEL NITROGENO	34
CAPITULO 5	
EL PROCESO DE FIJACION DE NITROGENO EN CIANOBACTERIAS- HETEROCISTICAS	35
5.1 Estructura del heterocisto	36
5.2 Bioquímica del heterocisto	41
5.2.1 Actividad fotosintética del heterocisto	57

5.2.2	Metabolismo del carbono	64
5.2.3	Metabolismo nitrogenado	66
5.2.4	La nitrogenasa	67
5.2.5	Mecanismo de reacción de la nitrogenasa	70
5.2.6	Asimilación de nitrógeno atmosférico	74
CAPITULO 6		
	PARTE EXPERIMENTAL .	76
6.1	Cianobacterias	76
6.2	Material de vidrio	76
6.3	Aparatos	76
6.4	Reactivos	77
6.5	Esterilización del material	77
6.6	Medio de cultivo	78
6.7	Condiciones de crecimiento	80
6.8	Evaluación del crecimiento	80
6.9	Curvas de crecimiento, cianobacterias normales	82
6.10	Curvas de crecimiento, cianobacterias tratadas con antibiótico	82
6.11	Tratamiento con antibiótico (Nostoc sp)	83
6.12	Tratamiento con antibiótico (Anabaena sp)	84

6.13 Determinación de la actividad de la nitrogenasa 85

CAPITULO 7

RESULTADOS

7.1 Curva de crecimiento (Anabaena sp normal) 88

7.2 Curva de crecimiento (Nostoc sp normal) 89

7.3 Curva de crecimiento (Anabaena sp tratada con antibió-



90

7.4 Curva de crecimiento (Nostoc sp tratada con antibió -
tico) 91

7.5 Porcentaje de conversión 92

CONCLUSIONES. 93

BIBLIOGRAFIA. 94-110.

1.-

ANTECEDENTES

La esencia para el mejoramiento de las plantas ha sido y es la selección y recombinación genética.

En los últimos 20 años se ha adicionado la mutagénesis para la generación de nuevas variedades.

Estos métodos han sostenido en niveles elevados el rendimiento en las cosechas desde hace 100 años, sin embargo incrementarlos es cada vez más difícil.

En suma, para sobrepasar la presión que ejercen: los cambios en el medio ambiente, depredadores, enfermedades, mejorar la utilización del nitrógeno y aumentar la eficiencia fotosintética se utiliza la cruce de plantas.

Poco en los últimos años ha crecido el interés en la aplicación de técnicas de ingeniería genética para resolver los problemas que representa la cruce de plantas. Definiendo a la ingeniería genética como cualquier método no convencional de manipulación genética que permita la transferencia de genes entre plantas y de otros organismos a plantas.

Estas técnicas no convencionales se dividen en 2 procesos:

- 1.- Molecular
- 2.- Celular

En el proceso molecular están incluidos métodos que involucran - el uso de ADN purificado y ADN protegido., mientras que en el - proceso celular se incluyen métodos que planean la transferencia - de organelos, cromosomas intactos y fusión de células.

La exitosa introducción de ADN a las células vegetales así - como efectuar con éste una modificación genética permanente es - un proceso altamente complejo. Para una evaluación sistemática - puede dividirse en 5 pasos bioquímicos:

- 1.- Introducción
- 2.- Integración
- 3.- Replicación
- 4.- Expresión
- 5.- Transmisión

Todos estos procesos excepto la integración son esenciales para - la exitosa modificación del genoma.

La integración de la información genética que se transfiere - al genoma vegetal es deseable porque la estabiliza y facilita - su replicación, sin embargo no es un prerequisite absoluto ya - que numerosas células, incluyendo vegetales, poseen moléculas de - ADN estable, funcional pero no integrado al núcleo tanto en mito- condria como en cloroplasto.

1.1- INTRODUCCION DE ADN A TEJIDOS VEGETALES

La introducción de ADN a plantas ha sido demostrado en nu - merosos sistemas y numerosas técnicas. Se acepta que el ADN exó - geno es tomado por embriones germinados y por plántulas. (4)(27a)-

El destino del ADN inmediatamente después de su introducción - sin embargo es objeto de controversia, varios investigadores han - reportado que el ADN exógeno aplicado no solamente es tomado - por las células vegetales si no también es integrado a su geno - ma y replicado con él. (27a).

Otros investigadores no han observado ni replicación o - integración -

del ADN exógeno y concluyen que el destino final del ADN que se absorbe es la degradación para la síntesis de ADN endógeno.(4)

La evidencia para la replicación de ADN exógeno está basada principalmente en experimentos de gradientes de centrifugación en cloruro de cesio.

Dos tipos principales de experimentos se han manejado, unos que se refieren a integración y otros a replicación.

En los experimentos que investigan la integración, ADN marcado radiactivamente de densidad diferente que el ADN huésped es administrado a plántulas que después de un periodo, el ADN total de las plántulas o ADN aislado de órganos se aísla y se analiza por técnica mencionada.

La aparición de bandas de ADN radiactivo y de ADN donador se toma como evidencia para la introducción de ADN .

La aparición de ADN radiactivo aproximadamente intermedias en densidad entre el ADN huésped y donador se toma como evidencia de integración del ADN radiactivo (donador) con ADN no radiactivo (huésped).

La banda de ADN con densidad intermedia es posteriormente analizada por sonicación y desnaturalización .

Experimentos de esta naturaleza han sido utilizados para demostrar la integración de ADN de Micrococcus lysodeikticus dentro de ADN de cebada y la integración y translocación de ADN de E.coli y S.coelicolor dentro de Arabidopsis (4).

Similares argumentos se han presentado para la integración de ADN de T4 dentro de plántulas de M.incana (4).

Aunque la "nueva" banda de ADN de densidad intermedia en estos casos fué considerablemente más pesada (1.724 g/cm^3) que la del huésped (1.698 g/cm^3) o la del donador (1.694 g/cm^3).

Los experimentos de "replicación" se han conducido de una forma similar, excepto que ADN no radiactivo (donador) de diferente densidad que la del huésped es utilizado en un sistema al cual después de un periodo de metabolismo, se le aplica timidina ^3H y el ADN huésped se aísla y analiza en gradientes de densidad de cloruro de cesio. La aparición de bandas radiactivas de densidad intermedia se toma como evidencia de replicación del complejo de ADN donador-huésped.

El análisis por desnaturalización y sonicación de esta fracción de ADN replicado con densidad intermedia, indica que se trata de una molécula con doble hélice que cambia a una densidad

más alta por desnaturalización, pero se separa en dos picos radiactivos con una densidad aproximadamente igual a la del ADN donador y huésped al romperla por sonicación.

Estos experimentos efectuados por Ledoux y Huart (1) les llevaron a la conclusión de que el ADN (donador) se unía a la molécula de ADN (huésped) mediante un enlace cabeza con cabeza y posteriormente adquiría estructura de doble hélice. El fracaso de obtener evidencias más sólidas que confirmen la integración y replicación de ADN exógeno por plantas impulsa a reexaminar el fenómeno de introducción de ADN exógeno a plantas.

Aparentemente la introducción de ADN exógeno ha sido demostrada en muchos casos:

La introducción de ADN de P.aeruginosa a plántulas de chícharo y tabaco (2), experimento realizado por Bendich y Filner, del cual concluyeron que el ADN bacteriano parcialmente degradado puede ser tomado por las plántulas, pero no pudieron detectarlo en el núcleo celular.

Kado y Larquin (3) fueron incapaces de detectar la replicación de ADN de A.tumefaciens en plántulas de Phaseolus aureus por técnicas de reasociación, a pesar de que la sensibilidad de - -

esta es más grande en varios ordenes de magnitud que la técnica de gradientes de densidad de cloruro de cesio, sus resultados fueron completamente negativos.

La cuestión de la penetración de ADN exógeno dentro de la membrana nuclear o fuera de la membrana nuclear ha sido considerada por pocos investigadores, Hotta y Stern (4) observaron que remover el ADN donador de los espacios intracelulares y de tejidos vasculares es sumamente difícil, concluyendo que el ADN bacteriano puede estar presente en el citoplasma de las células y asociarse con el nucleo unicamente durante el proceso de aislamiento.

En suma, la introducción, integración y replicación de ADN exógeno en plantas es un buen intento pero para lograrlo se requieren muchos experimentos futuros.

1.2 INTRODUCCION DE ADN A PROTOPLASTOS.

Las células vegetales que ordinariamente poseen pared celular, cuando ésta se les elimina se les denomina protoplastos.

Estos últimos han sido empleados en una gran variedad de experimentos: Acción de reguladores de crecimiento, investigaciones-

sobre la naturaleza y fisiología de la membrana celular, biosíntesis de la pared celular, aislamiento de organelos, introducción de proteínas, hibridización somática (5), infección sincrónica de protoplastos por partículas virales (27b).

Heyn y Schilperoort (4) trabajaron con protoplastos aislados de tabaco para tratar de diferenciar entre el ADN que penetró en la membrana celular y el que simplemente quedó adsorbido en la pared celular, aislaron los protoplastos de células tratadas con ADN antes de aislar el ADN total de las células para análisis sobre gradientes de cloruro de cesio.

Ellos encontraron que una considerable cantidad de ADN que aparentemente había sido tomado por las células fue solamente adsorbido por la pared celular y eliminado durante el proceso de aislamiento de los protoplastos.

Protoplastos en los cuales penetró DEAE-Dextrano fueron aislados de los que el DEAE-Dextrano no penetró y posteriormente analizados, en el caso de células en las que no penetró el DEAE-Dextrano, cantidades muy pequeñas de ADN de A. tumefaciens de alto peso molecular fue detectado en los protoplastos. En el caso de las células en las que penetró el DEAE-Dextrano se encontró ADN de A. tumefaciens de alto peso molecular, fue detectado en los protoplastos este fue calculado y representó únicamente el 0.145% del ADN de alto peso molecular que se unió firmemente a la pared celular; este ADN se asumió dentro de la célula aún cuando no hicieron la diferenciación entre el ADN unido a la membrana celular y el que realmente penetró la membrana. No obstante se ha visto que mucho del ADN presumiblemente tomado por la célula vegetal se une a la pared celular, queda atrapado entre la pared celular y la membrana o se une a la membrana.

No observaron integración del ADN exógeno bacteriano en el ADN -
vegetal.

Larquin y Hotta (4) en experimentos similares investigaron -
la ruta de ADN de E.coli y M.lysodeikticus en callos de Arabidopsis -
thaliana despues de 7 dias de incubación en presencia de ADN bacteria-
no. Aislaron el ADN celular total y posteriormente analizado en gra -
dientes de densidad de cloruro de cesio y por cinética de reaso -
ciación. No se detectaron secuencias de ADN bacteriano por estas -
pruebas en el tejido vegetal y el destino del ADN exógeno fué la -
degradación y reutilización en lugar de la integración y replicación.

Ohyama, Gamburg y Miller (4) estudiaron la introducción de ^{14}C -ADN-
de E.coli por protoplastos de Ammi visnaga y encontraron una consi -
derable cantidad (0.6-2.8%) del ADN de E.coli fué tomado por los -
protoplastos, de esta cantidad, alrededor del 20% fué precipitable con -
ácido. Este experimento desafortunadamente sólo contó con este crite -
rio para medir la introducción de moléculas de ADN, es bien cono -
cido que pequeños oligonucleótidos pueden ser precipitables por -
ácido tricloroacético, asimismo todavía permanece sin resolver el pro -
blema de adsorción contra introducción real de ADN exógeno.

Aunque tratamientos con ADNasa después de la incubación fueron utilizados en este experimento la pregunta debe ser contestada más contundentemente, al menos con respecto a la introducción en el núcleo, por núcleos aislados de protoplastos en presencia de exceso de ADN de timo de ternera (4).

Otros estudios sobre la introducción de ADN a protoplastos realizados por Hoffmann (4) que empleó ADN de Petunia hybrida con doble marca y protoplastos de P.hybrida aislados del mesófilo como célula huésped, en estos experimentos los núcleos fueron aislados (pero no en presencia de ADN heterólogo) y mostraron que contenían alrededor de 0.04% de la radiactividad suministrada, mientras que el ADN citoplasmático contenía 0.007% de la radiactividad.

El ADN aislado mostró tener aproximadamente el mismo radio $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ que el ADN donador por lo que síntesis endógena de ADN exógeno presumiblemente no ocurrió aunque no debe ser totalmente excluida. Estos experimentos sobre protoplastos de plantas son fuertemente sugestivos aunque no probados rigurosamente.

En conclusión parece ser que la introducción de ADN exógeno a protoplastos ofrece tal vez una mejor oportunidad para -

introducir información genética a plantas.

Pero no hay evidencias para la integración o replicación del ADN exógeno en células vegetales.

Igualmente(4) hay evidencias que sugieren la probabilidad de transferir genes bacterianos a células vegetales por fagos transductantes pero estos son expresados por un lapso breve.

Ciertamente no hay evidencias que indiquen que genes extraños puedan sobrevivir en células vegetales, la observación de que genes extraños puedan ser expresados en plantas únicamente es por tiempo breve pero por si misma muy significativa, que puede ayudar a elucidar los factores que prolonguen su expresión y eventual estabilización como parte del genoma huésped.

1.3 INTRODUCCION DE ORGANELOS A PROTOPLASTOS DE PLANTAS

Recientes avances en tecnología de protoplastos han permitido efectuar transplantes de organelos a protoplastos. Carlson(6) reportó el transplante de cloroplastos verdes normales a protoplastos de mesófilo aislados de hojas de una variedad mutante albina de N. tabacum, las plantas fueron regeneradas de protoplastos albinos y contenían cloroplastos verdes, plantas verdes completas-

fueron presumiblemente recobradas.

Estos trabajos fueron censurados por Potrykus (4) que es -
diando la introducción de cloroplastos verdes a protoplastos -
de petunia albina, encontró que la introducción de cloroplastos -
verdes a protoplastos albinos conducía a una mezcla de células -
conteniendo de 1-20 cloroplastos verdes y de 50-100 plástidos -
blancos.

A pesar de que las plantas no fueron regeneradas en este ex-
perimento, Potrykus concluyó que las células pueden dar un eleva-
do número de plantas matizadas y no solamente plantas completa -
mente verdes, posteriormente sugirió que los resultados obteni -
dos por Carlson se debieron a la existencia de quiméras del tipo:
verde/blanco/blanco.

Recientemente, Kung y col. (7) investigaron la marca genéti-
ca de una planta híbrida derivada después de la incorporación-
de cloroplastos de N. suaveolens en protoplastos de tejido blan -
co de un mutante albino en mosaico de N. tabacum. En este caso la -
presencia de genes del cloroplasto y nucleares puede ser deter -
minada por análisis de la fracción protéica I de estas plantas.
La fracción protéica I (ribulosa difosfato carboxilasa) consta de -
dos subunidades diferentes: una denominada pequeña y la otra grande -
La subunidad grande es codificada por el ADN del cloroplasto (8) -

y la subunidad pequeña es codificada por el ADN nuclear (9) .-

En el experimento de introducción reportada por Kung (7) re - generó solamente un individuo, una planta matizada de morfología y - número anormal de cromosomas (un rango de 61-66) y además estéril, - el número normal de cromosomas somáticos de N. suaveolens y de N. ta - bacum es de 32 y 48 respectivamente.

El análisis de la composición polipeptídica de la fracción - proteica I de la planta regenerada mostró que contenía la subunidad - grande de ambas, esto indicó claramente que los cloroplastos de N. sua - veolens fueron tomados por el protoplasto huésped. El análisis de la - subunidad pequeña mostró además la presencia de los genes que co - difican para la subunidad pequeña de N. suaveolens y N. tabacum lo - que indica que tanto núcleo como cloroplasto debieron haber sido - tomados por protoplastos de N. tabacum para darnos esta planta en - mosaico.

Bonnett y Eriksson (10) estudiaron la transferencia de cloro - plastos de Vaucheria dichotoma a protoplastos de zanahoria (Daucus - carota), la eficiencia de incorporación fué del 16% con el uso de - polietilenglicol.

Bonnett (11) demostró la localización intracelular de cloro - plastos de Vaucheria dichotoma en Daucus carota, el cloroplasto -

dentro del protoplasto no fué rodeado por una membrana límite -
sin embargo algunos poseían su membrana cloroplástica intacta.

Otros intentos para transferir funciones genéticas de microor-
ganismos a plantas han sido a través de la introducción de microor-
ganismos intactos a protoplastos vegetales.

Davey y Cocking (12) reportaron la introducción de Rhizobium-
leguminosarum a protoplastos de chícharo, mas recientemente Davey y-
Power (4) demostraron que protoplastos aislados de Parthenoci- -
ssus tricuspidata pueden tomar células de levaduras, protoplas -
tos de levaduras y algas azul-verdes, la microscopía electrónica -
muestra que los microorganismos estaban localizados en vesículas -
rodeados por membranas en el citoplasma de los protoplastos de la-
planta superior.

Burgoon y Bottino(13) demostraron la introducción de Gleocap-
sa (alga azul-verde) a protoplastos de maíz y tabaco, pero el tiem-
po más largo de mantenimiento de un microorganismos dentro de un -
eucariote fué demostrado con A.vinelandii dentro del hongo Rhizo-
pogon sp detectando además actividad de nitrogenasa durante 55 -
dias .(14) .Los experimentos discutidos en la serie anterior pro-
veen algunas esperanzas para la manipulación genética de plantas-
por medio -

de técnicas de transferencia de organelos y microorganismos a protoplastos.

Existen dos grandes obstáculos para la aplicación inmediata ó a futuro cercano de esta técnica.

1.-La regeneración de plantas fértiles a partir de protoplastos solamente ha tenido éxito en pocos géneros: Nicotiana, Daucus - Petunia, Asparagus, Brassica, Datura y Ranunculus. Estos éxitos sugiere solamente es cuestión de tiempo y de refinamiento de las técnicas para que la lista aumente, aunque hasta la fecha no se ha logrado con las plantas más importantes económicamente hablando.

2.-Todavía tiene que demostrarse que los cloroplastos o núcleos pueden ser exitosamente transferidos y que estos logren establecerse entre especies o géneros de plantas que no puedan cruzarse sexualmente.(4) .

1.4


FUSION DE CELULAS SOMATICAS.-

En la sección anterior se discutieron algunos métodos involucrados en transferir información ya sea por medio de molé -

culas y organelos a plantas.

A la ingeniería genética en plantas debe sumarse la fusión de 2 células somáticas llevando diferente información genética, un proceso análogo a la fusión sexual pero sin el inconveniente de las barreras de incompatibilidad.

Hoy es relativamente fácil obtener grandes cantidades de protoplastos de órganos de muchas especies de plantas y de células vegetales en cultivo (15), lo que limita el éxito de la hibridación de células somáticas para generar nuevas plantas es originado por la carencia de adecuados mecanismos de selección (marcadores genéticos) para el aislamiento de heterocariontes o híbridos de la mezcla de fusión de protoplastos, y de nuestra incapacidad para regenerar plantas de protoplastos de muchas especies.

Protoplastos de un número elevado de especies vegetales, incluyendo cereales, han sido cultivados para fijar su potencial morfológico, pero la eficiencia de plaqueo de protoplastos aislados de muchas especies con excepción de Nicotiana tabacum sin embargo  necen bajos (15).

Inicialmente los protoplastos fueron fusionados en presencia de nitrato de sodio (16)(17).

Keller (4) mejoró la eficiencia de fusión de protoplastos de tabaco con altas concentraciones de calcio (0.05 M) y p^H alto (10.5) .

Kao y Michayluk (18) y Eriksson (15) encontraron que el polietilenglicol eleva e induce la eficiencia de fusión de protoplastos. Este agente aglutinante ha acreditado su eficiencia para trabajos de fusión y ha sido utilizado universalmente en muchos sistemas, por ejemplo: introducción de organelos o microorganismos a protoplastos de plantas vegetales y fusión interreinos (19), (20) e inclusive fusión de protoplastos bacterianos (21). Aumentando la eficiencia de fusión de protoplastos se incrementa significativamente la posibilidad de fusión nuclear (4).

La regeneración de plantas híbridas después de fusión de protoplastos ha sido efectuada con Nicotiana glauca y Nicotiana langsdorffii (17) (22), mutantes de tabaco (23), y especies de petunia (24) -

En cada caso las plantas fueron sexualmente compatibles y los híbridos somáticos obtenidos pueden compararse con los producidos mediante cruce sexual.

La esperanza de obtener híbridos de especies de plantas sexualmente incompatibles mediante fusión de protoplastos todavía perma-

nece lejana y evasiva.

Carlson, Smith y Dearing (17), fusionaron exitosamente protoplasmas de N. glauca y N. langsdorffii y obtuvieron el híbrido interespecífico. La selección del producto de fusión se basó en el crecimiento diferencial del híbrido y los padres bajo las condiciones de cultivo empleadas. La progenie del producto de fusión fue analizada para detectar presencia de genes nucleares y citoplasmáticos de los padres mediante electroenfoque de los componentes de la fracción proteica I (4).

Los polipéptidos de la subunidad pequeña (indicativos de genes nucleares) de ambos padres fueron detectados.

Los polipéptidos de la subunidad grande de N. glauca (indicativa de genes del cloroplasto) también fueron encontrados, pero no hay señales que indiquen la presencia de polipéptidos de la subunidad grande de N. langsdorffii.

Desafortunadamente, solo fue examinada la progenie de un híbrido parasexual, por lo que no es posible concluir que este sea un fenómeno general. Son necesarios estudios posteriores para evaluar las características citoplasmáticas de híbridos somáticos.

Smith, Kao y Combatti (22) repitieron los experimentos de hibridación somática entre N. langsdorffii y N. glauca los que efectuaron analizando con detalle 23 plantas híbridas regeneradas, encontrando que estas contienen un número variable de cromosomas.

El número de cromosomas en estos híbridos varía dentro de un rango comprendido de 56 -64 .Se atribuyen estos resultados, principalmente a triple fusión de protoplastos seguida de pérdida de cromosomas durante el crecimiento del callo y subsiguiente desarrollo de la planta.

La aparición de número aberrante de cromosomas y la estabilidad del cariotipo, particularmente en plantas regeneradas a partir de cultivo de callus de especies de Nicotiana ha sido reportada(26).

Melchers y Labib (27) y Melchers, Keller y Labib (28) produjeron híbridos somáticos por fusión de protoplastos de dos diferentes mutantes haploides: clorofila-deficientes y sensibles a la luz de N. tabacum, la selección de híbridos se realizó sobre complementación genética, de suerte que los productos de fusión originaron callos verdes normales que fueron fácilmente diferenciados de -

los callos mutantes.

Los híbridos somáticos fueron obtenidos también por cruce sexual normal para compararlos y se encontraron idénticos a los producidos por fusión de protoplastos. Puesto que mutantes clorofila deficientes existen en gran abundancia entre las plantas superiores, un sistema de selección basado en su uso da un valor significativo a los estudios de hibridización somática.

Power y col. (24) produjeron recientemente una planta híbrida por fusión de protoplastos de Petunia hybrida con protoplastos de Petunia parodii. Ellos emplearon un sistema de selección basado en la existencia en la naturaleza de sensibilidad diferencial de protoplastos heteroespecíficos a antimetabolitos (específicos)

Productos interfamiliares e intergéneros obtenidos por fusión de protoplastos muestran un heterocariocito que solamente experimenta pocas divisiones celulares (29). La formación de callos híbridos no ha sido ordinariamente obtenida, su fracaso se atribuye principalmente a la ausencia de sistemas de selección, otras causas todavía no bien entendidas en términos moleculares reside en la incompatibilidad de protoplastos para que se logre la fusión, esto puede ser un fenómeno genotípico o fenotípico.

Power (30) intentó sin éxito recobrar un híbrido somático - después de fusionar protoplastos de Petunia hybrida y Partheno- cissus tricuspidata y atribuyó la eliminación de petunia del pro- ducto de fusión a la asincronía de fases del ciclo mitótico.

Dos recientes y alentadores reportes(31)(32) describen la - producción de callos híbridos interfamilias al fusionar Soya-Ni - cotiana. En estos experimentos emplearon métodos mecánicos para - aislar el producto de fusión, el híbrido fué inicialmente inesta - ble perdiendo gran cantidad de cromosomas de Nicotiana, pero los - segmentos remanentes de Nicotiana parecen ir sincrónicos con el - ciclo celular de Soya, si se reproducen estos resultados se demos - trará al menos que el principio de incompatibilidad de especies - relacionadas, pero distantes, puede ser pasado por alto mediante - técnicas de hibridización somática. El potencial morfogénico del - híbrido reportado sin embargo, está por determinarse.

La fusión de células somáticas con el fin de modificar gené - ticamente o crear nuevas plantas es una técnica alentadora, pero to - davía tendrá que probarse y desarrollarse.

La fusión clara de células de especies que pueden cruzarse -

sexualmente es posible, pero tendrá que ser demostrada en otros géneros para sumárselos a Nicotiana y Petunia.

Además esta técnica es de gran utilidad para el desarrollo y estudio de la regulación genética en plantas, pero la aplicación para lograr fusión intergenérica requerirá desarrollar tecnología adicional y un mayor entendimiento del desarrollo básico de las plantas y sus procesos genéticos.



2.-

OBJETIVO

El propósito de este trabajo es efectuar una revisión de algunos métodos que se han empleado para intentar modificar la información genética en plantas y revisar el metabolismo nitrogenado en Cianobacterias fijadoras de nitrógeno, con el fin de adquirir los conocimientos necesarios para ver la posibilidad de pasar los genes nif a plantas.

Se anexa un adendum, de los experimentos efectuados para tratar de aislar líneas de Cianobacterias resistentes a antibiótico que conserven actividad de nitrogenasa para emplearlas posteriormente con el fin anteriormente expuesto.

3.-

INTRODUCCION

Kumar (33)(34)(35) y Singh(36) seleccionaron ciertas líneas de A.nidulans (cianobacteria) unicelular no fijadora de nitrógeno mediante subcultivos sucesivos en medio líquido conteniendo concentraciones crecientes de antibióticos (Streptomycina y Penicilina) .

Gupta y Kumar (37) encontraron que estas líneas resistentes a antibióticos conservaron este rasgo completamente estable después de varios subcultivos en medio libre de antibiótico, también investigaron este aspecto recurriendo al método modificado por Luria y Delbrück (38) y encontraron que un pequeño número de mutantes resistentes a antibiótico pueden existir en poblaciones sensibles y estas pueden ser seleccionadas en el medio de cultivo.

Con la ventaja del advenimiento de técnicas de plaqueo, exitosamente se han aislado clonas de ciertas algas unicelulares y filamentosas después de exponerlas a mutágenos.(36).

Sin embargo la eficiencia de clonación sobre agar necesita ser considerada cuidadosamente, puede no estar completamente justificada al considerar que todas las colonias que se desarrollan sobre la placa de agar son estrictamente clonales, ya que puede haber oportunidad para que algunas colonias puedan desarrollarse de dos o más células en lugar de una célula simple. De aquí el juicio crítico efectuado a algunos trabajos iniciales sobre la selección de mutantes en medios líquidos, sobre el fundamento de que tal vez algunas mutantes no son estrictamente clonales y esto es igualmente aplicado a las técnicas en agar.

Mutantes resistentes a antibióticos han sido empleadas principalmente para detectar transformación y recombinación. La carencia de marcadores adecuados en algas azul-verde es uno de los más grandes problemas para puntualizar estos sucesos.(36).

3.1.- RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.



Análisis del fenómeno de resistencia a agentes antimicrobianos han demostrado tener importancia tanto por su significado en el laboratorio como en la clínica. Con relación al primero, estudios efectuados en bacterias mutantes resistentes a drogas, han proporcionado importante información sobre la naturaleza de los sitios de unión de las drogas, y sobre la función bioquímica de la molécula o macromolécula-receptora. Estos estudios han sido importantes en el presente para poder entender aspectos de genética y bioquímica microbiana concernientes con la pared celular y proteínas asociadas (Penicilina), ribosomas (Estreptomina, Eritromicina), replicación (ácido nalidixico), transcripción (Rifamicina), síntesis de proteínas (Acido fusídico) y muchos aspectos del metabolismo intermediario.

En el segundo, el incremento en el uso de agentes antimicrobianos ha proporcionado una fuerza selectiva que favorece a las líneas de bacterias que han adquirido resistencia a dichos agentes, ya sea por mutación o por herencia de plásmidos (R) (40).

Los plásmidos son elementos genéticos que han enriquecido los rasgos bacterianos, y se ha observado un incremento en el número de especies bacterianas que los poseen, la característica distintiva de un plásmido es la separación física de éste en relación al cromosoma bacteriano. Ciertos plásmidos también son capaces de integrarse reversiblemente con el cromosoma huésped, como alternativa a su estado extracromosomal, plásmidos con esta propiedad dual se les ha llamado Episomas. (41).

Recientemente Van den Hondel (42) caracterizó las propiedades físicas de plásmidos en Cianobacterias sin detectar hasta el momento la función que les confieren, las que fundamentalmente pueden ser: resistencia a antibióticos, a metales pesados, sexualidad, biodegradación de compuestos aromáticos, producción de bacteriocinas, de vacuola gaseosa o de incrementar su rendimiento fotosintético.

La presencia de estos plásmidos presumiblemente provee una-

ventaja metabólica selectiva sobre las demás especies libres de plásmidos. Muchos plásmidos R (que confieren resistencia a antibióticos) son inestables y pueden perderse rápidamente en ausencia de antibiótico (40).

Los posibles mecanismos bioquímicos de resistencia, de acuerdo con las predicciones de Davis y Mass (40) son los siguientes:

- 1.-Alteración del sitio blanco en la célula que reduce o elimina la unión de la droga con el mismo.
- 2.-Bloqueo del transporte del antibiótico hacia el interior de la célula independientemente del mecanismo que esté involucrado en el transporte (no específico o activo), un cambio en el sistema de transporte puede reducir la penetración de la droga.
- 3.-Detoxificación o inactivación del antibiótico.
- 4.-Reemplazo del paso metabólico que inhibió el agente antimicrobiano .
- 5.-Incrementando el nivel de la enzima inhibida por la droga.
- 6.-Producción de un metabolito que pueda antagonizar el efecto inhibitorio de la droga.
- 7.-Disminución de las necesidades metabólicas de la célula para la vía o reacción inhibida por la droga.

Si consideramos estos posibles mecanismos de resistencia, podemos observar que los mecanismos: 1,2,5,7., pueden ser fácilmente obtenidos por mutaciones en punto de genes estructurales o genes regulatorios en ausencia de cualquier otro evento. Sin embargo, para muchos antibióticos parece improbable que los mecanismos: 3,4,6., puedan presentarse por simple mutación de genes cromosomales; en estos casos se requieren nuevas funciones celulares que pueden ser proporcionadas solamente por herencia de genes en forma de plásmidos.(40).

No hay hasta la fecha ejemplos de resistencia a antibióticos por medio de los mecanismos: 5,6, y 7.(40).

3.2 MECANISMO DE ACCION DE LA ACTINOMICINA-D

Las Actinomicinas (fig.1) (Actinomicina-C₁(D)). Son antibió -

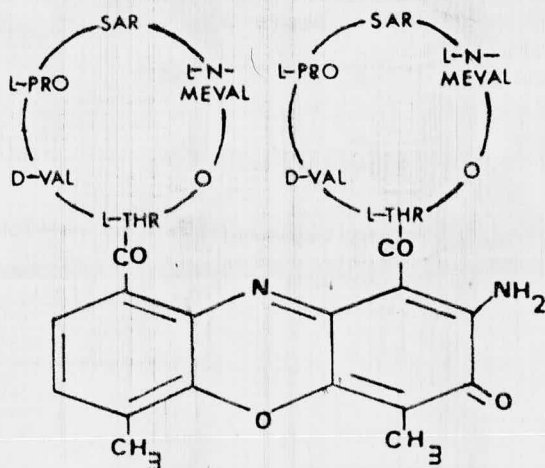


Fig. 1

ticos cromopéptidos altamente tóxicos que se unen al ADN y de esta forma interfieren con sus funciones normales.

Estos antibióticos son los prototipos y los más ampliamente investigados de los inactivadores de la función de molde del ADN.

La molécula de Actinomicina-D, consta de una parte cromófora la cual es un sistema heterocíclico (anillo de Fenoxazona) - unido a dos oligopéptidos cíclicos.

La conformación de las uniones peptídicas son las siguientes: L-treonina-D-valina, trans; D-valina-L-prolina, cis; L-prolina-sarcosina, cis; sarcosina-L-metilvalina, trans; L-treonina-oxígeno carboxílico de la carboxamida y carbono del cromóforo, trans.

La unión de la Actinomicina-D al ADN causa interferencia con las funciones del mismo, en cuanto a la inhibición de la síntesis de ARN tanto en organismos eucariotes como en procariotes.

Varias técnicas han sido empleadas para detectar la formación del complejo: ADN-Actinomicina-D:.

Perturbación del espectro visible del antibiótico, decremento de la densidad de flotación del ADN, elevación de la temperatura de fusión del ADN, equilibrio de diálisis utilizando Actinomicina-D-

radiactiva e inhibición de transcripción (ARN polimerasa).

La formación del complejo suprime la síntesis de todas las formas de ARN, y es diferencial, dependiendo de la concentración y del tamaño del ARN.

La Actinomicina-D inhibe la síntesis de ARN puesto que la ARN polimerasa es bloqueada a nivel de la elongación de la cadena de ARN (no de iniciación).

La inhibición puede ser superada mediante la adición de más ADN, pero no por la adición de más enzima.

La estequiometría de la unión Actinomicina-D:ADN (1 : 2) es consecuencia directa de la simetría de la molécula y refleja que dos equivalentes químicos se unen a sitios disponibles de la desoxiguanosina, necesarios para la formación del complejo.

Las dos moléculas de desoxiguanosina interactúan con cada residuo peptídico cíclico formando una pila a ambos lados del sistema cíclico de Fenoxazona, un fuerte enlace de hidrógeno (2.82 - 2.80 Å), conecta el grupo 2 amido de la guanina con el oxígeno del carbonilo del residuo de L-treonina, mientras que un enlace débil de hidrógeno (3.15-3.25 Å) conecta el N 3 del anillo de guanina con el grupo N-H del mismo residuo de L-treonina.

En suma: el sistema cíclico de Fenoxazona de la Actinomicina-D-

se intercala entre la secuencia G_pC de ADN de doble hélice, mientras que la subunidad peptídica se aproxima a la estrecha estría de la doble hélice de ADN e interactúa con residuos de desoxiguanosina en la cadena opuesta por medio de enlaces de hidrógeno específicos.

Las evidencias concernientes a la conformación del polinucleótido son las siguientes:

La Actinomicina se une fuertemente a ADN de doble hélice, pero debilmente a todos los ARN de doble hélice, cadenas simples de ADN o ARN y a hélices híbridas de ADN:ARN.

Las evidencias que favorecen el reconocimiento de enlaces de hidrógeno son:

La unión de la Actinomicina-D al ADN requiere de residuos de desoxiguanosina: el grupo 2-amino sobre la guanina es esencial para la unión. Por lo que polímeros sintéticos semejantes al ADN del tipo: d(A-T), dA.dT, d(I-C), y dI.dC no se unen a la Actinomicina-D, mientras que polímeros del tipo: d(G-C), dG.dC, d(DAP-T) y d(2AP-T) se unen fuertemente a la Actinomicina-D.

El grupo 2-amino del residuo de purina parece ser esencial para la unión, la sustitución del grupo 2-amino del sistema cíclico de la - -

fenoxazona por un grupo hidroxilo, dimetil amino o cloro, inhibe la reacción de unión Actinomicina-D:ADN.

Evidencias que favorecen la intercalación:

Detalles moleculares indican que el modelo de intercalación al interactuar Actinomicina-D con ADN es estequiométricamente posible, con excepción del grupo 3-amino del sistema de fenoxazona que es 0.6 Å más cerrado que el oxígeno de la desoxiribosa. (27b).

Sobell(43) con la información de que la guanina tiene un papel importante en la unión de la Actinomicina-D al ADN, y basándose en análisis de rayos X de un complejo cristalino formado por Actinomicina-D y desoxiguanosina propuso un modelo que combina la intercalación (fundamentalmente) y uniones exteriores.

En este modelo; enlaces de hidrógeno entre el antibiótico y el grupo 2-amino de la guanina tienen un papel central, el sistema de fenoxazona de la Actinomicina-D se intercala entre G-C del ADN donde los residuos de guanina pertenecen a la banda opuesta y los grupos 2-amino de la guanina interactúan con ambos peptidocíclicos.

4.- IMPORTANCIA DE LA FIJACION DEL NITROGENO

El incremento de la población mundial y la depleción de las fuentes de combustibles fósiles han estimulado el interés en los métodos para incrementar la producción de alimentos y a la vez disminuir el consumo de materias primas no renovables.


Uno de los factores limitantes más importantes en la producción agrícola lo constituyen los fertilizantes nitrogenados y su síntesis es la que requiere una mayor cantidad de energía.

Aproximadamente el 3% (16.8×10^9 metros cúbicos) del gas natural consumido en los Estados Unidos de América durante 1973 - fué utilizado para la síntesis de 153×10^8 kg de amonio (17×10^6 ton U.S.) y alrededor de 10×10^6 ton U.S. de éste, fue aplicado directamente como fuente nitrogenada para complementar una demanda anual de nitrógeno para la agricultura de 18×10^6 ton U.S. de amonio (44).

Una de las reacciones importantes en la ecología del planeta es la fijación de nitrógeno cuya primera fase: de nitrógeno atmosférico a amonio es llevada a cabo exclusivamente por procariontes ya sea en forma simbiótica o de vida libre (45). La investigación de los factores ecológicos que intervienen en este proceso permitirá racionalizar el consumo de combustibles fósiles.

5.- EL PROCESO DE FIJACION DE NITROGENO EN CIANOBACTERIAS HETEROCIS-
TICAS.

Las Cianobacterias se cree que aparecieron sobre la tierra ha -
ce más de 3 billones de años, son procariotes fotosintéticos los cua-
les obtienen electrones para la reducción del bióxido de carbono a-
partir del agua desprendiendo oxígeno.

Durante el curso de la evolución estos organismos han sido -
la ma  fuente de oxígeno en la atmósfera y por lo tanto los prin -
cipales responsables del cambio de una atmósfera primitiva reducti-
va a una actual oxidante.

Sus características fotosintéticas son muy similares a las -
encontradas en los cloroplastos de plantas verdes, organelo cuyos -
predecesores pudieron ser Cianobacterias.

Estos procariotes probablemente desarrollaron actividades fo-
tosintéticas como consecuencia del agotamiento de sustratos orgá -
nicos y evolucionaron a fijadores de nitrógeno atmosférico como -
consecuencia del agotamiento de amonio en el mar pre-cámbrico.

Como la fijación de nitrógeno requiere de un ambiente anaero -
bio, este requerimiento lo reconciliaron con la evolución fotosinté-
tica de oxígeno al diferenciar unas células vegetativas a otras es-
pecializadas con una gruesa pared celular a la que se ha denomina
do heterocisto.

a intervalos regulares a lo largo del filamento por ende, la maquina -
ria sensible al oxígeno para la fijación del nitrógeno se segregó en -
el heterocisto del sistema fotosintético desprendedor de oxígeno.

Los heterocistos proveen un medio ambiente para la protección -
de la nitrogenasa, en primer lugar mediante cambios estructurales, que -
reducen la entrada de gases de cualquier tipo mediante la síntesis -
de una gruesa pared celular, además reorganizan el aparato fotosinté -
tico al eliminar de el heterocisto la actividad de fotosistema II -
que desprende oxígeno, mientras retienen el poder generador de ATP -
del fotosistema I, establecen eficientes bombas en la unión con ce -
lulas vegetativas vecinas que les aseguran una fuente de carbono pa -
ra generar poder reductante indispensable para el proceso de fija -
ción del nitrógeno, todo esto unido a un eficiente sistema removedor -
de oxígeno (superóxido dismutasa y catalasa).

Estos aspectos de la diferenciación están ahora razonablemen -
te bien documentados, aunque algunos necesitan ser aclarados sobre to -
do a nivel bioquímico particularmente el de las bombas. (62)

5.1.-

ESTRUCTURA DEL HETEROCISTO.

Morfológicamente los heterocistos difieren de sus antecedentes-

células vegetativas en 5 aspectos:

- 1.-Sus conexiones con las células vecinas son mucho menos extensas.
- 2.-Están rodeados por una gruesa cubierta.
- 3.-Contienen vastos tapones de enorme material homogéneo en ambos polos.
- 4.-La configuración de sus tilacoides es diferente.
- 5.-Tienen mucho menos material nuclear, tal vez ninguno.

Las conexiones entre el heterocisto y las células vegetativas demandan estudios futuros, porque ellas deben estar íntimamente relacionadas con las bombas que controlan el flujo de carbono dentro del heterocisto y de nitrógeno fuera del mismo, en sección transversal el septo que separa el heterocisto de la célula vegetativa es menos de un tercio del diámetro que separa dos células vegetativas, y el área de la sección transversal que limita la unión entre el heterocisto y la célula vegetativa debe ser menos de un décimo que la que existe entre células vegetativas, el septo contiene un conjunto de perforaciones denominado microplasmodesmata, las cuales conectan el citoplasma de las dos células.

Los canales son de al menos 400 Å de longitud y menores de 50 Å -

de diámetro, existe una carencia de información acerca de su ultra - estructura, número preciso, composición y si todos son idénticos. Puede ser por ejemplo, que existan conjuntos de canales especializados - en transporte unidireccional.

La cubierta que envuelve el heterocisto es una estructura notable, formada por 3 capas externas a la membrana más externa de la célula vegetativa.

La primera de estas capas aparece durante la diferenciación, se le denomina capa fibrosa por su apariencia inmutable al microscopio - electrónico, su composición no ha sido detectada con precisión.

La capa central, denominada homogénea está compuesta de un polisacárido con cadenas cortas laterales, la unidad que más se repite en A. - cylindrica es un trímero (glucosa-glucosa-manosa), todas en uniones beta-1-3. Cada monómero en este oligosacárido tiene unido en la posición 2, 4 o 6 otro monómero o disacárido, como una malla de oligosacáridos - alrededor del heterocisto, la capa homogénea es completa excepto en los polos de la célula donde está cruzada por el septo conteniendo los microplasmodesmata. Lo mismo se aplica para la capa íntima a la cual se le llamó laminada y es la última en ser adicionada (46), esta capa - tiene una composición química poco común; está compuesta: -

totalmente por glicolípidos únicamente encontrados en el heterocisto (47)(48). Los glicolípidos son de 4 clases, conteniendo un hidroxí-ácido o un alcohol C26 o C28. Cada clase contienen glucosa o galactosa (9:1) unidas al ácido o al alcohol terminal (52). Capas laminadas han sido purificadas y tienen el mismo punto de fusión que los glicolípidos que la componen (50).

A pesar de que sus características no han sido reportadas, la capa laminada puede ser impermeable al agua, iones, solutos neutros hidrofílicos y posiblemente gases disueltos.

Los heterocistos terminales contienen solamente un gránulo polar-visible al microscopio de luz como un objeto redondo y altamente refractivo (51). Los heterocistos intercalares contienen dos gránulos polares. Micrograffias electrónicas de heterocistos maduros muestran a los gránulos como tapones homogéneos que ocupan casi toda la región celular adyacente al septo (46). La composición de los mismos no ha sido conocida con certeza, trabajos recientes indican que contienen cianoficina, polímero de reserva compuesto de: multi L-arginil-poli-L-aspartico (52). Los tapones todavía no han sido purificados, como los gránulos de cianoficina desaparecen durante la diferenciación del heterocisto (durante ayuno de nitrógeno combinado) pudie---

ran ser un fantástico material de reserva acumulado, por lo que estaría en una importante situación de transporte frente al septo.

La reorganización del tilacoide en el heterocisto ha sido descrita sobre las bases de estudios de microscopía electrónica (46) - todavía no ha sido posible correlacionar estos cambios con la pérdida de la actividad del fotosistema II, exceptuando la eliminación de las ficobiliproteínas las cuales funcionan como antenas recolectoras de energía luminosa para el fotosistema II (53).

En general, las membranas tilacoides son desplazadas de la región central de la célula y reaparecen cerca de los polos más enrolladas que en las células vegetativas.

Finalmente hay una importante cuestión acerca del ADN del heterocisto. Las células vegetativas contienen un típico nucleóide de procariontes, región que en micrografías electrónicas muestra fibrillas (46). Ninguna de estas fibrillas aparecen en heterocistos, por lo que se sugiere que pueden carecer de ADN, tienen además significativamente reducida la absorción en la región ultravioleta, y heterocistos aislados contienen mucho menos ADN que las células vegetativas, la cantidad precisa es difícil de determinar porque el ADN de las células vegetativas tiende a unirse al heterocisto y porque los heterocistos preparados mediante digestión con lisozima o por sonicación-

pueden tener algunos preheterocistos, los cuales en la etapa temprana del programa de diferenciación retienen su ADN (54).

5.2 BIOQUIMICA DEL HETEROCISTO

Muchos de los trabajos sobre la bioquímica del heterocisto toman como punto de partida la hipótesis de que el heterocisto es la célula especializada para la fijación del nitrógeno, Stewart y col. (55) mostraron evidencias que demostraron que los heterocistos son el sitio de actividad de la nitrogenasa y que el nitrógeno fijado es transportado rápidamente a las células vegetativas asociadas, además por autoradiografía utilizando $^{14}\text{CO}_2$ demostraron que el heterocisto no fija bióxido de carbono, todo esto en A. cylindrica.

Honorée Fleming y Haselkorn, R. (56) estudiaron la incorporación de $^{35}\text{SO}_4^-$ en N. muscorum por sus dos tipos de células y observaron que el incremento en la actividad de nitrogenasa es debido a síntesis de novo de la nitrogenasa predominantemente en el heterocisto aunque no exclusivamente. Se sabe que los requisitos para la fijación de nitrógeno son: nitrogenasa, ATP, reductantes y un ambiente anaerobio- cada uno de estos a su vez tiene requisitos especiales.

Por ejemplo, la expresión de los genes *nif* en bacterias está sujeta a una regulación compleja. Los genes *nif* fueron caracterizados por Brill y col. (57) en *K. pneumoniae* y denominados: *nifQBALFMSNEKD*HJ. (fig. 2)-

El análisis de las proteínas codificadas por los genes *nif* en *K. pneumoniae*, así como su caracterización efectuada por Brill y col. (58) proporcionó los siguientes datos:

nifQ: Como todas las líneas conteniendo mutaciones en *nifQ* muestran altos niveles de reducción de acetileno in vivo e in vitro, se infiere que la proteína codificada por *nifQ* no es absolutamente esencial para generar componentes I y II activos. Las proteínas que se requieren para la fijación de nitrógeno in vitro son: Nitrogenasa (componente I) que es un tetrámero ($\alpha_2\beta_2$) con un peso molecular de 54,000 (subunidad beta) y de 57,000 (subunidad alfa). El componente II (nitrogenasa reductasa) es un dímero constituido por dos cadenas polipeptídicas idénticas de 34,000 daltones.

El componente I contiene un cofactor constituido por Fe, Mo y S- (FeMoco) que es su sitio activo, este cofactor tiene la propiedad de restaurar la actividad in vitro de ciertas mutantes defectivas en la habilidad de reducir nitrógeno gaseoso.

nifB: Cepas conteniendo mutaciones en *nifB* mostraron bajas -

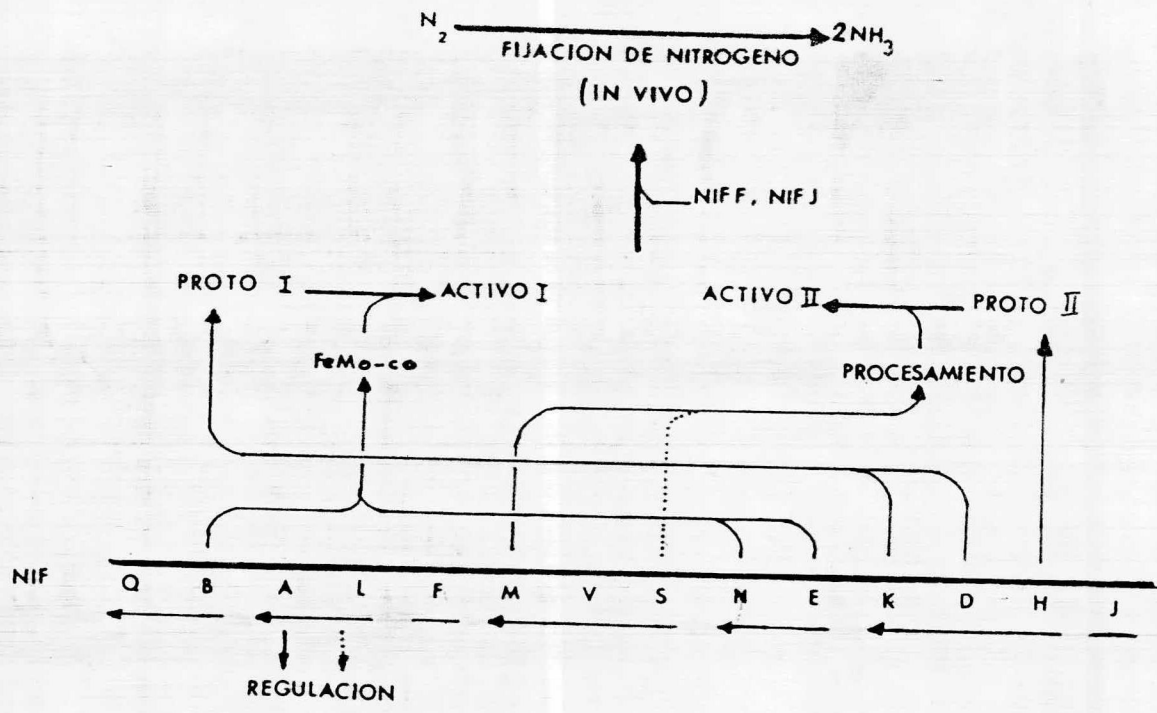


FIG. 2

cantidades de reducción de acetileno in vivo e in vitro y ésta - reducción puede ser estimulada drásticamente mediante la adición - ya sea de componente I o cofactor (FeMoco). Con el antecedente de - que las líneas NifB⁻ sintetizan componentes I y II activables por - adición de FeMoco, se sugiere un papel esencial del producto del - gen nifB en la síntesis del FeMoco.

nifA: Mutantes NifA⁻ carecen de la habilidad de reducir aceti- leno in vivo e in vitro. La falta de estimulación en la actividad - reductiva del acetileno después de adicionar componentes I y II pu- rificados, así como; la carencia de proteínas Nif identificables por - geles en dos dimensiones, es consistente con el modelo de que los pro- ductos codificados por nifA pudieran requerirse para dereprimir los - genes nif, presumiblemente juegan el papel de factor de contro posi- tivo.

nifL: Como todas las líneas NifL⁻ caracterizadas exhiben po - laridad por encima de nifA, no es una sorpresa que mutaciones en nifL - muestren un fenotipo pleitrópico negativo, similar a las mutaciones - en nifA, tanto in vivo como in vitro.

nifF: Mutantes nifF tienen pequeñas pero significativas cantida- des de actividad reductiva del acetileno in vivo y por lo tanto -

fué una sorpresa que su actividad in vitro fuera comparable a la del tipo silvestre. Aparentemente el producto codificado por el gen $nifF$ no está involucrado en la síntesis de los componentes I y II activos. Geles en dos dimensiones indicaron que líneas $NifF^-$ sintetizan todos los productos de los genes nif con excepción de una (17K). La habilidad de extractos de líneas $nifF^-$ de reducir acetileno in vitro con Ditionito como fuente de electrones, sugiere que la proteína 17K pueda estar involucrada en el transporte de electrones hacia la nitrogenasa in vivo. Los datos no son concluyentes de que la proteína 17K sea un producto del gen $nifF$. Permanece la posibilidad de que la proteína 17K sea sencillamente inductor de altos niveles de síntesis de el producto del gen $nifF$.

$nifM$: Líneas $NifM^-$ presentan bajos niveles de actividad reductiva del acetileno in vivo. In vitro, la adición de componente II la estimula.

Geles en dos dimensiones mostraron cantidades normales de componentes I y bajos niveles de componente II (especialmente el de 39,000 daltones) comparados con la cepa silvestre.

La presencia de cantidades significativas de componente II inactivo,---

unido a la inserción de bacteriofago Mu, en el gen $nifM$, apoyan la tesis de que $nifM$ no es un gen estructural para el componente II, mas bien está involucrado en un paso necesario para su procesamiento y genera de esta forma un componente II activo.

$nifV$: - Como las líneas $NifQ^-$, las $NifV^-$ presentan altos niveles de actividad reductiva de acetileno in vivo e in vitro, el producto codificado por el gen $nifV$ no es aparentemente esencial para la síntesis de componentes I y II activos, tampoco ha sido involucrado en la síntesis de otras proteínas Nif en base a los datos aportados por los geles en dos dimensiones.

$nifS$: - Líneas $nifS^-$ mostraron un comportamiento irregular, aparecen placas que difieren de las que carecen de la propiedad de fijar nitrógeno atmosférico; a la vez que carecen de actividad significativa de poder reductor de acetileno in vitro. El efecto regulatorio aparente que presentan sobre la síntesis de proteínas Nif puede ser directo al afectar transcripción, o indirecto. Puesto que al parecer es posible que los componentes I y II puedan tener algún papel en la derepresión de varias proteínas Nif, un efecto indirecto sobre la derepresión puede deberse a mutaciones las cuales no lograron producir componentes I y II capaces de producir derepresión.

Los resultados de ensayos in vitro sugieren que las líneas-
NifS⁻ conteniendo mutaciones en punto tienen bajos niveles de com-
ponente I activo, pero carecen de componente II activo. Como los ge-
les en dos dimensiones de líneas NifS⁻ revelaron bajas cantidades -
de los componentes I y II, parece posible que el componente II inac-
tivo haya sido sintetizado en estas líneas. El fenotipo de NifS⁻ pue-
de ser explicado si NifS codificó una proteína, la cual tiene invo-
lucrado un componente II procesado, así como un componente II sin -
procesar, el cual es inactivo y relativamente inestable, y de esta -
manera afecta la derepresión de todo el sistema.

nifN: - Líneas NifN⁻ son similares a NifB⁻ ; las dos presentan -
baja actividad reductiva del acetileno in vivo e in vitro y poseen -
componente II activo y un componente I que puede ser activado median-
te la adición de FeMoco.

Geles en dos dimensiones y ensayos in vitro sugieren que el -
producto del gen nifN es esencial en el proceso de síntesis del -
FeMoco.

nifE: - Líneas NifE⁻ son idénticas a nifN⁻ in vivo e in vitro, -
excepto que nifN⁻ presenta una cantidad de componente II activo -
considerablemente más baja. Los ensayos in vitro sugieren que la -
proteína codificada por el gen nifE participa en un paso esencial
en la síntesis del FeMoco.

nifK:--Líneas NifK⁻ poseen cantidades insignificantes de actividad reductora de acetileno in vivo y sus extractos fueron activados únicamente mediante la adición de componente I activo. La mayoría de las líneas NifK⁻ carecen de ambas subunidades del componente I (60K y 57K), caracterizadas en geles de dos dimensiones, solamente una línea NifK⁻ mostró una proteína 60K alterada, se piensa que nifK aparentemente es un gen estructural para esta proteína (la subunidad ácida del componente I).

Como mutaciones en nifK dieron como resultado una reducción en los niveles de las proteínas Nif, se cree que la proteína codificada por este gen está involucrada en el mecanismo de derepresión de los genes nif.

nifD:--Líneas NifD⁻ son similares a las NifK⁻ con la única excepción que la inserción del bacteriófago Mu en NifD da como resultado una disminución del componente II demostrada en ensayos in vitro y en geles de dos dimensiones.

La existencia de líneas NifD⁻ con alteraciones en la carga de la subunidad (56K) es evidencia concluyente de que nifD codifica para la subunidad básica del componente I (56K). Como en el caso de las líneas NifK⁻ la disminución de las cantidades de proteínas Nif en geles de dos dimensiones y en ensayos sugieren que el componente I -

pueda tener alguna intervención en el mecanismo de derepresión .

nifH:--Líneas $NifH^-$ tienen baja actividad reductora de acetileno in vivo y presentan una variedad de fenotipos en geles pero todas carecen de componente II activo. Los fenotipos pueden explicarse en base a dos modelos: Uno que implica observaciones de un componente II en función regulatoria ya sea a nivel de traducción o transcripción de los genes que codifican para la síntesis del componente I o un segundo modelo en el cual el componente II es necesario para la estabilidad del componente I y a la vez este último de alguna forma es necesario para la derepresión de los genes nif.

En el primer modelo esta función regulatoria podría ser otra actividad del componente II unida a su función catalítica. Un componente II, el cual de alguna forma alterado pierda su función regulatoria puede ser detectado en geles pero es incapaz de intervenir para elevar los niveles del componente I, presumiblemente esta acción del componente II tendría la forma de un bloqueador del ARNm entre los genes nifH y NifD. El control de la síntesis del componente I mediante el componente II podría ser un mecanismo útil por el cual se producirían relaciones correctas de los componentes I y II,

se sabe que un exceso del componente I puede inhibir la fijación de nitrógeno. (59).

El último modelo tiene más apoyo por el resultado de geles en dos dimensiones practicados a extractos de líneas nifH que no presentan componente I visible (sin utilizar marca radiactiva), mientras que en extractos con marca radiactiva si se encuentra componente I, estos hallazgos sugieren que la estabilidad es el problema del componente I en las líneas nifH.

nifJ:--Líneas NifJ⁻ al igual que NifF⁻ presentan bajos, pero detectables niveles de actividad reductora de acetileno in vivo y muy alta actividad in vitro.

El fracaso al adicionar componentes I y II para tratar de estimular la actividad, acompañado con resultados de alta actividad sin la adición de estos componentes sugiere que el producto nifJ, no es esencial para generar componentes I y II activos.

A pesar de que el producto del gen nifJ no es necesario para la reducción del acetileno in vitro, y no es requerido para la formación de los componentes I y II activos, este está presente en altos niveles en la célula, y es un elemento indispensable para la fijación de nitrógeno atmosférico in vivo.

Virtualmente todas las líneas NifJ⁻ carecen de cantidades significativas de una proteína (17K), se piensa que la proteína (120K), producto del gen nifJ pueda actuar como regulador o estabilizador de la proteína (17K).

Análisis de complementación efectuados con el bacteriófago - Mu indicaron que existen 5 operones policistrónicos, y dos monocistrónicos: nifQ nifB, nifA nifL, nifF, nifM nifV nifS, nifN nifE, nifK nifD nifH, y nifJ. Además:

1.-Que los productos de 3 genes: nifB, nifE, nifN. Están involucrados en la síntesis del FeMoco.

2.-El producto del gen nifM (y tal vez el de nifS), participa en la formación del componente II activo.

3.-Las funciones reguladoras están tentativamente asignadas a: nifA, nifL, (nifK-nifD), nifH y nifJ.

4.-Los productos de nifJ y nifF son requeridos para la reducción del acetileno in vivo pero no in vitro.

Klebsiella pneumoniae, al parecer, ha evolucionado un elaborado sistema para regular la expresión de los genes *nif*.

Este sistema modulador de la fijación de nitrógeno, involucra a la enzima glutamino sintetasa.

La glutamino sintetasa realiza dos funciones: enzima y proteína reguladora. En la figura 3A se muestra una de las 12 subunidades de la glutamino sintetasa y a lo largo de ésta, hipotéticos sitios de unión de varias moléculas pequeñas que funcionan como sustratos y cofactores.

Por la sofisticada forma como es regulada a la glutamino sintetasa se le ha llamado, "El cerebro nitrogenado de la célula".

Estudios realizados por Staldtman y Holzer (27c) en K.aerogenes demostraron que la habilidad de la glutamino sintetasa de formar glutamina, puede decrecer rápidamente mediante la unión de grupos adenililos a grupos hidroxilo de residuos de tirosina específicos de cada una de las 12 subunidades de la glutamino sintetasa.

Por el contrario, la habilidad de formar glutamina se incrementa rápidamente al eliminarle estos grupos (fig. 3C).

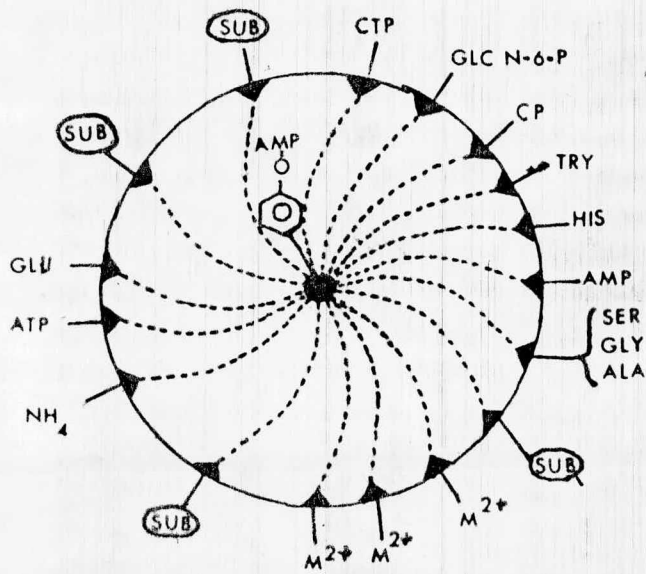


Fig. 3A

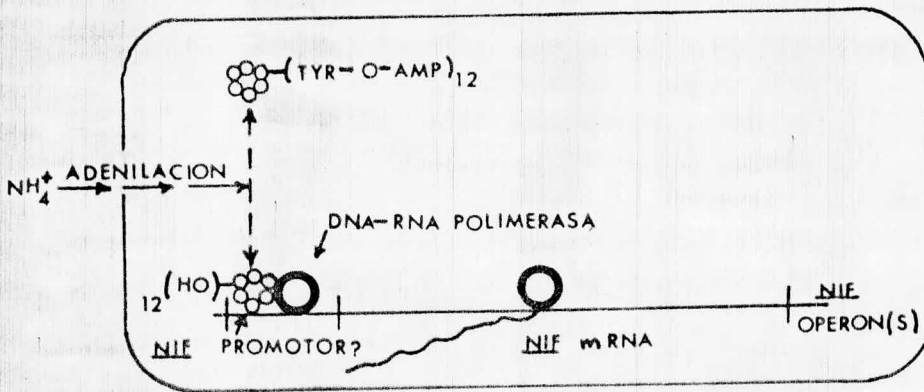


Fig. 3B

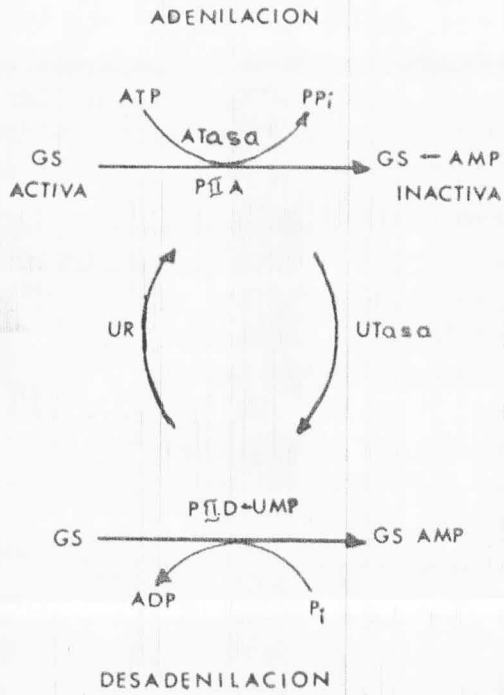


Fig. 3C.

Ambas formas de la glutamino sintetasa (adenilada y deadenilada) tienen actividad de transferasa, que es la habilidad de transferir el grupo glutamino de la glutamina a la hidroxilamina en presencia de ADP.

Las reacciones de adenilación y deadenilación son catalizadas por la misma enzima: ATasa (ATP:glutamino sintetasa adeniltransferasa). La reacción que cataliza la ATasa está regida por la proteína regulatoria (P_{II}) y efectores metabólicos como: α -cetoglutarato, ATP, glutamina y fosfato inorgánico.

La forma inmodificada de P_{II} ; P_{HA} , estimula la adenilación, mientras que una forma uridilada (P_{HD}) se requiere para la deadenilación. La interconversión de P_{HA} a P_{HD} es consumada por una tercera enzima: la Uridiltransferasa (UT_{asa}).

La UTasa es activada por 2-cetoglutarato e inhibida por glutamina, consecuentemente, una relación alta de 2-cetoglutarato a glutamina característica de células creciendo en un medio deficiente en amonio estimulará la deadenilación de la glutamino sintetasa, y al contrario, una relación baja: 2-cetoglutarato a glutamina característica de células creciendo en medios con un exceso de amonio, estimulará la adenilación.

Desde hace mucho tiempo se sabe que el NH_4^+ (primer producto de la fijación de nitrógeno) reprime los genes que sintetizan la nitrogenasa. Robson (60) determinó que el oxígeno y el amonio son represores de la síntesis de los componentes I y II de la nitrogenasa, al no observar incorporación de $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ y actividad de nitrogenasa.

Esto aparentemente asegura que la nitrogenasa sea producida únicamente cuando no exista otra fuente de nitrógeno utilizable.

Un modelo de trabajo propuesto para la regulación de los genes *nif* por medio de NH_4^+ , con base en conceptos actuales, se ilustra en la fig. 3B. En este modelo, tiene relevancia la existencia de un sistema enzimático conocido como "sistema enzimático de adenilación en cascada". El cual básicamente ya fué descrito.

Este modelo muestra que 10-20 seg después de la adición de NH_4^+ al medio de cultivo cuya fuente de nitrógeno era el atmosférico, se presenta una marcada perturbación en los niveles de glutamina, glutamato y otros metabolitos relacionados. La súbita elevación o disminución de estos compuestos activan el sistema de adenilación en cascada, el cual cataliza la modificación covalente de la glutamino sintetasa por la unión o eliminación-

de la mitad de las 12 unidades de adenina unidas a residuos es -
pecíficos de tirosina distribuidas sobre cada una de las 12 sub-
unidades proteicas idénticas.

La glutamino sintetasa con sus 12 residuos de adenina tiene-
enormemente reducida la actividad biosintética de glutamina sin-
tetasa en comparación con la enzima no adenilada, inclusive una va-
riedad de parámetros catalíticos de la enzima son influenciados -
por la modificación de los residuos de tirosina.

Siguiendo a este efecto bioquímico de cascada, la expresión ge-
nética de la nitrogenasa es de alguna manera bloqueada.

La idea más simple fundamentada ampliamente en experimentos-
efectuados en los laboratorios de Magasanik sobre sistemas enzimá-
ticos relacionados, es que la adenilación de los residuos de tiro -
sina, sugiere que se bloquea la unión de la glutamina sintetasa al-
operador de los genes nif, una pequeña región del ADN esencial pa-
ra la expresión de los genes que codifican para la síntesis de la -
nitrogenasa.(61).

A la inversa, la deadenilación de la glutamino sintetasa, que-
se efectua cuando las células fijadoras de nitrógeno están cre -
ciendo en un medio de cultivo que contiene nitrógeno combinado,

y son colocadas en un ambiente donde deben obtener su nitrógeno de la atmósfera, permite la unión efectiva de la glutamina sintetasa y la subsecuente activación de la transcripción de los genes *nif*.

Se postula la interacción entre: glutamino sintetasa y ADN-ARN polimerasa al *nif* operador - promotor para producir el ARN mensajero para la expresión de los genes *nif*.

El mejor apoyo experimental para este modelo de control de la expresión de los genes *nif*, proviene de estudios realizados con mutantes en las cuales la expresión de los mismos está permanente y continuamente conectada como consecuencia de una mutación estructural en la glutamino sintetasa. (61). Estas mutantes producen continuamente nitrogenasa aún en presencia de iones amonio, en ellos se ha encontrado que tienen catalíticamente inactiva la glutamino sintetasa, pero ésta puede ser detectada inmunológicamente.

De este modo, alteraciones genéticas de la glutamino sintetasa pueden tener dramáticos efectos sobre la expresión de los genes *nif*. En este caso la continua expresión de los mismos fue permanente. (61).

Que la glutamino sintetasa de alguna manera está involucra -

da en el control de la expresión de los genes *nif* es apoyada por otros hallazgos experimentales:

1.-Ciertas líneas que requieren glutamino sintetasa para su crecimiento, y que al mismo tiempo no pueden sintetizar nitrogenasa, adquieren la habilidad de producir nitrogenasa después de recibir por conjugación un plásmido que lleva los genes para la síntesis de la glutamino sintetasa.(61).

2.- La introducción de plásmidos que acarreen los genes *nif*, a una bacteria no fijadora de nitrógeno relacionada (*K.aerogenes*), la cual tiene alterada la producción de glutamino sintetasa y es producida en cantidades elevadas. En este receptor, los genes *nif* transportados se expresan y son regulados en presencia de iones amonio.(61).

5.2.1.- ACTIVIDAD FOTOSINTETICA DEL HETEROCISTO

Las Cianobacterias contienen dos sistemas fotosintéticos semejantes a las plantas verdes.

El fotosistema II produce un débil reductor y un fuerte oxidante al romper la molécula de agua y generar oxígeno, el reductor débil se combina con un oxidante débil producido por el fotosistema I, por medio de una cadena de transporte de electrones que fosforila ADP, este proceso es conocido como fotofosforilación no cíclica -

Cuando el fotosistema II no funciona (por destrucción como en el heterocisto) o por estar bloqueado con el herbicida DCMU (3(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea), el reductor fuerte y el oxidante débil producidos por el fotosistema I se combinan a través de una cadena de transporte de electrones (acortada) fosforilando ADP, a este proceso se le denomina: fotofosforilación cíclica.

Los compuestos encargados de separar la producción de oxidantes y reductores en cada fotosistema son los centros de reacción (existen dos centros de fotorreacción: el correspondiente al fotosistema I, que es el centro de reacción que provee los electrones para la reducción del bióxido de carbono, y el fotosistema II, que -

es el centro de reacción que genera el poder oxidante necesario - para la abstracción de electrones del agua. Están compuestos de parejas de moléculas de clorofila en distintos estados de excitación - las cuales pueden ser fotooxidadas, propiedad que reside en complejos - protefina - clorofila y aceptores primarios de electrones.

Estos grupos están asociados con antenas recolectoras de energía, las cuales están formados de complejos protefina - clorofila y - su función es absorber energía y transferirla a los centros de reacción.

En Cianobacterias, los complejos ficobilipigmentos - protefina - que constituyen más del 40% de las proteínas solubles de la célula - la funcionan como pigmentos recolectores de energía exclusivamente - para el fotosistema II, la secuencia que se propone es : (ficoeritri - na - ficocianina - alloficocianina - clorofila (a670) - centro de reacción.) (53).

La transferencia de Cianobacterias fijadoras de nitrógeno a - un medio ambiente libre de nitrógeno combinado da por resultado la - pérdida de la ficocianina en un 50-70% de todas las células. (53) - (63)(64).

La síntesis de ficocianina se reanuda en las células vegeta -

tivas cuando las cianobacterias se convierten en fijadoras de nitrógeno. La reanudación de la síntesis de ficocianina en heterocistos viejos ha sido reportada por Thomas (65). Los heterocistos aislados carecen de la característica banda de absorción de la ficocianina (máximo a 620 nm) cuando fueron analizados por microespectrofotometría. (53)(66)(67).

La pérdida del espectro de absorción de la ficocianina se correlaciona con la degradación de la proteína, las bandas de ficobiliproteína están ausentes en geles de poliacrilamida efectuados a extractos de proteínas totales de heterocisto (56)(68). La degradación es efectuada por una proteasa cuyo sustrato específico son las ficobiliproteínas. (69)(70).

La ausencia de ficobilipigmentos sugiere que el heterocisto carece de actividad de fotosistema II lo cual desde un punto de vista teleológico podría ser una ventaja, ya que el oxígeno generado por el fotosistema II inactivaría a la nitrogenasa.

La presencia de clorofila (a680) y carotenoides es indicador de que el fotosistema I está activo en el heterocisto. Goelheer mostró que en algas azul-verde la transferencia de energía de carotenos-

a clorofila acontece exclusivamente en el fotosistema I .(53).

Claramente, la carencia de ficobiliproteínas no es suficiente para explicar la ausencia de actividad de fotosistema II en el heterocisto. Existen mutantes de cianobacterias en las cuales la ficobilinas estan ausentes y las células retienen la actividad de fotosistema II (62). Igualmente existen mutantes de plantas verdes que no tienen sus grupos análogos recolectores de energía pero son fotosintéticamente competentes.(62). Por lo tanto es claro que se requieren modificaciones en el fotosistema II para eliminar el desprendimiento de oxígeno.

A este respecto se conoce que la maquinaria que libera oxígeno es dependiente de la presencia de Mn^{++} unido, la relación de Mn^{++} unido a clorofila en el heterocisto es solamente del 10% que el de las células vegetativas.(71).(72).

Hay discrepancias en cuanto a la valencia del manganeso pero por su alto potencial el par : ión mangánico/manganeso ($Mn^{+++}/-Mn^{++}$), $E_0 = 1.5$ V ($P^H = 7.0$), ofrece una base atractiva para la teoría (73).

La relación de átomos de manganeso a moléculas de clorofila en organismos generadores de oxígeno es de : 1:50-100. Los tilacoi-

des de algas deficientes en manganeso, presentan numerosas malformaciones.

La reorganización de la unidad fotosintética en el heterocisto es señalada por mediciones del contenido celular de P_{700} , el tamaño de la unidad fotosintética (relación clorofila (a)/ P_{700}) y por el número de estas unidades por célula.

En el fotosistema I los centros de reacción se caracterizan por tener una clorofila especial fotooxidizable denominada P_{700} .

La relación de P_{700} a clorofila nos da el tamaño de la unidad fotosintética: que es de 170-180 en células vegetativas y de 1 a 60-90 en el heterocisto. (74)(75). El número de estas unidades por célula es de 50% más alto en el heterocisto que en células vegetativas (74), por lo tanto el decremento en el contenido de clorofila en el heterocisto (66)(67) debe atribuirse al tamaño y número de unidades fotosintéticas. Queda por resolver si el incremento en unidades fotosintéticas está acompañado por síntesis de nuevos componentes o por modificación de las unidades viejas. (62).

La cadena de transporte de electrones fotosintética de las cianobacterias se conoce, al menos posee un componente (cit. b₅₆₃) distinto a ambos sistemas de fotofosforilación (cíclico y no-cíclico) (76).

La cadena no cíclica de transporte de electrones incluye: citocromo b_{559} , plastoquinona, citocromo c_{554} (cit.f) y plastocianina; todos están presentes en el heterocisto, pero las cantidades en relación con las células vegetativas se desconocen (72).

La cadena cíclica de transporte de electrones utiliza: citocromo b_{563} (cit. b_6) que transfiere los electrones a plastoquinona o plastocianina, el citocromo b_{563} también está presente en el heterocisto (72) (fig.4).

Por último, los heterocistos pueden efectuar fotofosforilación in vitro en rangos suficientes para proporcionar el ATP necesario para la fijación de nitrógeno (12ATP/molécula de N_2) (72)(77)(81).

Estos resultados son consistentes con estudios efectuados en células enteras que sugieren que el ATP para la fijación de nitrógeno puede ser proporcionado totalmente mediante la fotofosforilación cíclica (78)(79)(80). La actividad de nitrogenasa en Anabaena cylindrica es máxima solamente en presencia de luz. Esto indica una clara dependencia del fotosistema I. (82).

Otro punto a considerar es respecto a la naturaleza del reductante que es producido por el fotosistema I bajo condiciones no cíclicas. En las células vegetativas, uno de los aceptores pri-

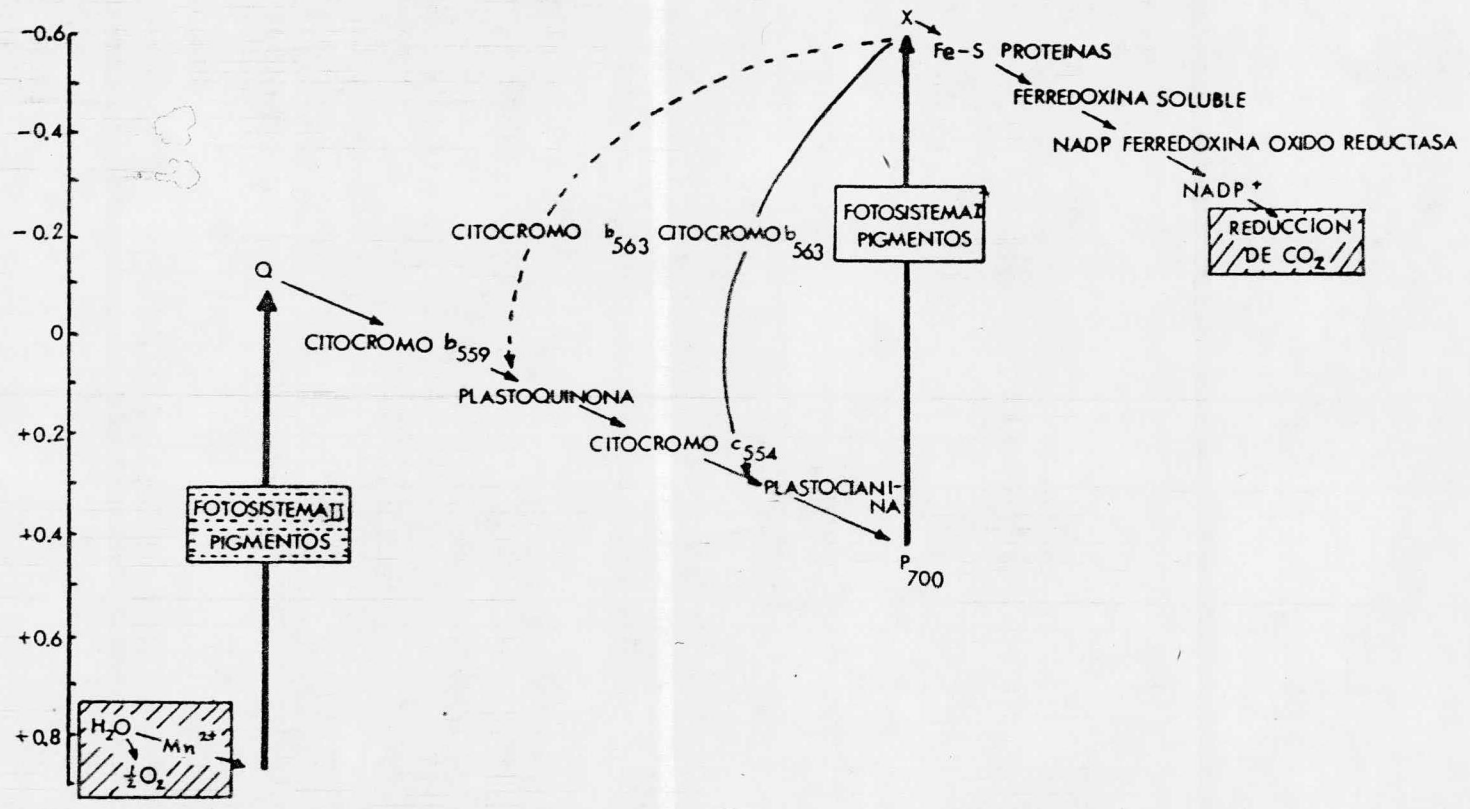


FIG. 4 .

marios del fotosistema I es una ferredoxina unida a membrana (83) - detectable por un espectro característico de RPE abajo de 30°K , - otros transportadores de electrones involucran a una ferredoxina-soluble y nucleótidos de piridina; estos últimos proporcionan - reductantes para la fijación del CO_2 via ciclo de Calvin. Las dos-ferredoxinas han sido purificadas de *Nostoc sp*, la más grande posee un centro activo constituido por :2Fe-2S por molécula, con un potencial (E_0) de -406 mV (84).

Los heterocistos retienen la señal característica de RPR de - la ferredoxina unida a membrana con otros valores de g de : 2.05 - 1.94, 1.92 y 1.89 (85). Se cree que la ferredoxina es el último aca-rrador de electrones hacia la nitrogenasa, sin embargo en bacte-rias el operon *nif* incluye un gen que se supone codifica para un - transportador de electrones para la nitrogenasa (45).

5.2.2.-

METABOLISMO DEL CARBONO

Las modificaciones del aparato fotosintético de los heterocistos están estrechamente ligadas a cambios drásticos en el metabolismo del carbono.

En las células vegetativas, los dos fotosistemas cooperan para producir ATP y reductantes para la fijación del carbono.

En el capítulo anterior hemos analizado que en el heterocisto la actividad del fotosistema I está centrada hacia la fosforilación cíclica y por lo tanto no es posible que sea capaz de proveer reductantes para la fijación de CO_2 . Por otra parte, si la fijación de CO_2 continuara en el heterocisto, el proceso competiría con la fijación de nitrógeno por reductantes y ATP.

La incapacidad del heterocisto para incorporar CO_2 , fué demostrada primero por autoradiografía, después de exponer por un tiempo breve a filamentos intactos de algas azul-verde a $^{14}\text{CO}_2$, sin embargo la marca mostró un rápido movimiento de las células vegetativas vecinas hacia el heterocisto como maltosa y glutamato principalmente, la naturaleza de este transporte se continúa estudiando (62)(86)(87).

Esta incapacidad del heterocisto para incorporar CO_2 tiene - sus causas directamente demostrables:

La actividad de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa está ausente del heterocisto (88). La ausencia de esta actividad que normalmente adiciona CO_2 a la ribulosa 1,5 bifosfato para producir 2 - moléculas de fosfoglicerato, está correlacionada con la ausencia de - cuerpos poliédricos (carboxisomas) en el heterocisto de cianobacterias (89) y con la ausencia total de antígenos de carboxilasa en extractos de heterocistos de Anabaena (62).

Por lo tanto, sin un ciclo de Calvin operativo, el heterocisto puede dedicar suficiente ATP producido mediante la fotofosforilación cíclica para fijar nitrógeno y para la síntesis de proteínas, que lo conduzcan hacia la diferenciación (56)68).

La fuente de reductantes para la fijación de nitrógeno aún no está perfectamente identificada. Existe evidencia que indica - que la actividad de hexocinasa en extractos crudos es dos veces - más alta en el heterocisto que en células vegetativas y que la actividad de las enzimas: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y de 6-fos - fogluconato deshidrogenasa son al menos 6 a 8 veces más alta. (88)(90)(91).

En estas células, esta secuencia de reacciones enzimáticas - partiendo de glucosa, producirán dos moles de NADPH por cada mol - de glucosa. Los nucleótidos de piridina reducidos podrán entrar - a la cadena respiratoria y producir ATP o alternativamente podrán - ser empleados para reducir a la ferredoxina. (91). Fig. 5 .

5.2.3.- METABOLISMO NITROGENADO.

Los heterocistos maduros difieren de las células vegetati - vas, con respecto al metabolismo nitrogenado en 3 importantes as - pectos:

- 1.-Contienen nitrogenasa.
- 2.-Altos niveles de glutamino sintetasa.
- 3.-Bajos niveles de glutamina oxoglutarato amido transferasa.

Estos aspectos representan un nivel mas de diferenciación que - es necesario analizar por separado para percibir la funcionalidad - que implican.

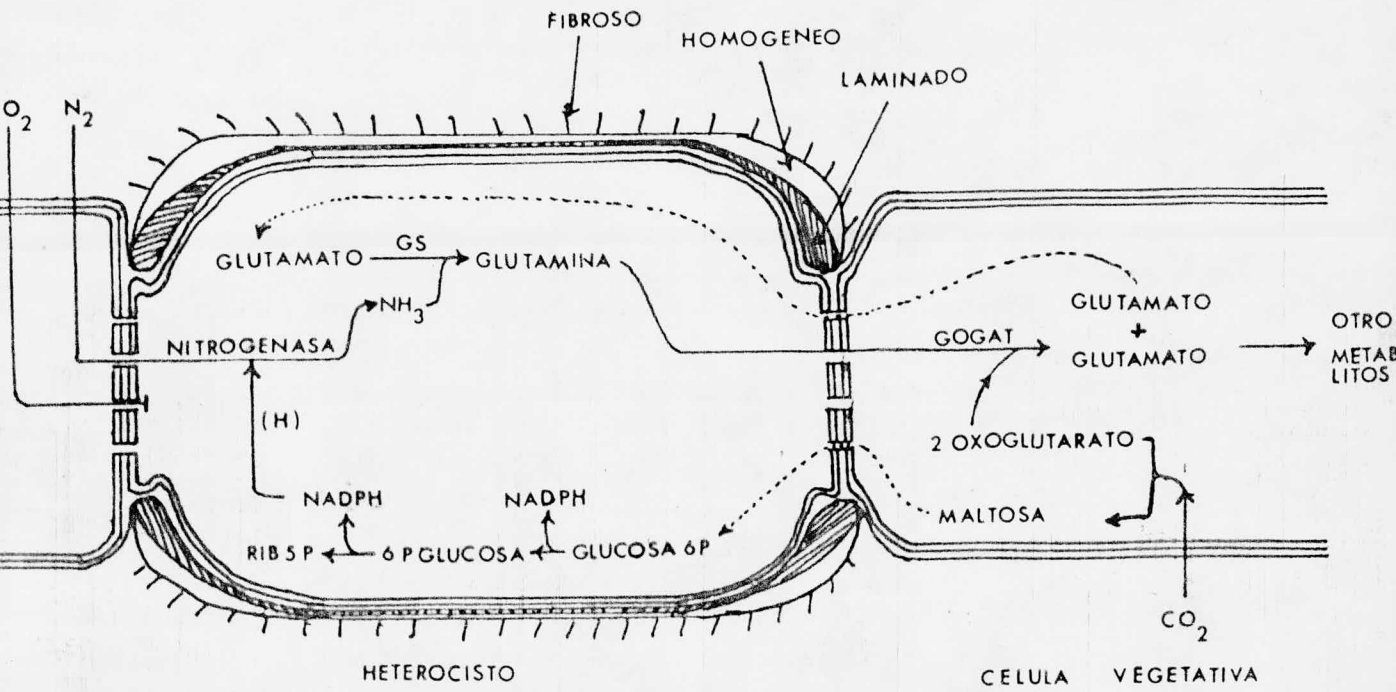


Fig.5.-Modelo del flujo de carbono y nitrógeno entre el heterocisto y la célula vegetativa. (62).

GS=Glutamino sintetasa.

GOGAT=glutamina oxoglutarato amido transferasa.

5.2.4.

LA NITROGENASA

Este sistema enzimático responsable de la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, consiste de dos proteínas; la proteína más grande (peso molecular 210,000-242,000) contiene Mo, Fe y Azufre ácido-lábil, mientras que la proteína pequeña (peso molecular 55,000-66,000) contiene Fe y azufre ácido lábil. Como ninguna proteína exhibe actividad catalítica cuando son separadas, se describen como un complejo enzimático catalíticamente competente.

Una explicación alternativa al comportamiento de las dos proteínas es que la proteína más pequeña funciona como una reductasa específica para la proteína más grande y de esta forma la proteína más grande reduce al nitrógeno; de aquí que a la proteína grande se le denomine con más exactitud nitrogenasa (equivalente a MoFe-proteína, componente I y molibdoferredoxina) y a la proteína pequeña: nitrogenasa reductasa (equivalente a componente II, Fe-proteína y azoferredoxina) (94).

El componente I del sistema de la nitrogenasa tiene un cofactor que contiene: Mo, Fe y S²⁻ en una relación 1:8:6, este ha sido purificado (95) (96).

Los siguientes datos apoyan la teoría de que el FeMoco -

es el sitio activo de la nitrogenasa y probablemente el sitio de unión del nitrógeno atmosférico para que sea subsecuentemente-reducido.(95).

1.-Es capaz de catalizar la reducción del acetileno in vitro en presencia de borohidruro de sodio aunque su actividad (34 nmoles de etileno formado/min/nmol de Mo) tan solo representa el 8% en relación a la actividad de la nitrogenasa (in vivo)

2.-Mutantes de K.pneumoniae, que producen un componente I - inactivo puede ser activado in vitro mediante la adición del cofactor de fierro y molibdeno (FeMoco) purificado a partir de componente I activo.(95).

La reacción de nitrógeno atmosférico a amonio, requiere de la adición de 6 electrones, como no se han establecido ejemplos entre iones simples, átomos o moléculas en las cuales se transfieran simultaneamente 2 o más equivalentes reductores, es razonable asumir que esta reacción debe consistir de varios pasos, cada uno probablemente involucra la transferencia de no más de 2 equivalentes .

El mecanismo más simple requerirá de 3 sucesivas adiciones de 2 equivalentes reductores para producir primero: diimina -

(HN=NH), luego hidracina (H_2N-NH_2) y finalmente amonio.

El amoniaco y la hidracina son compuestos estables, la diimina por otro lado es un compuesto muy inestable, aunque se han reportado complejos sólidos en las dos formas isoméricas (cis-trans) conteniendo diimina ya sea, en forma ionizada o neutra. (96).

Los calores y energías libres de formación en Kcal/mol (en el caso del amoniaco por 2 moles) que se muestran a continuación - (96).

<u>Molécula</u>	<u>Estado</u>	<u>Hf^o</u>	<u>Gf^o</u>
N_2H_2	gas.	48.7	---
N_2H_4	liq.	12.0	---
	aq.	8.1	30.5
$2NH_3$	gas.	-22.0	-7.9
	aq.	-38.6	-12.7

Muestran que la reducción de N_2 a NH_3 es termodinámicamente favorable, sin embargo la formación de hidracina libre es desfa -

vorable y la de la diimina es extremadamente desfavorable, por lo que el problema real de la fijación de nitrógeno por los microorganismos es poder salvar la adición altamente endotérmica de los dos primeros electrones.

Termodinámicamente el primer paso: esto es, $N_2 + 2H \rightarrow N_2H_2$ - puede efectuarse utilizando un agente reductor más poderoso que el H_2 y/o mediante la estabilización de la diimina.(96).

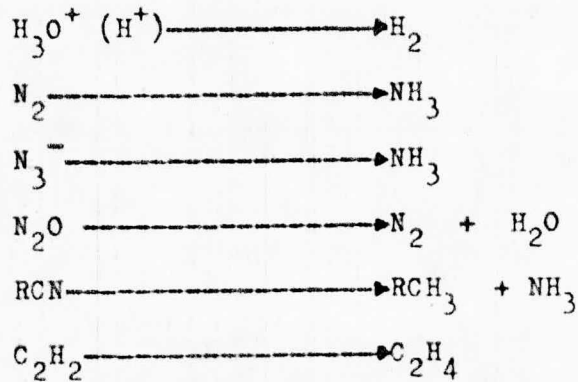
5.2.5.- MECANISMO DE REACCION DE LA NITROGENASA.-

Tso y Burris (97), demostraron que el complejo: MgATP se une específicamente al componente II (nitrogenasa reductasa). Como resultado de esta unión, el potencial del componente II baja y le confiere la propiedad de reducir a la nitrogenasa (componente I).

Es difícil medir el potencial del complejo Fe-proteína-Mg-ATP pero se cree que es de aproximadamente -400 mV, el componente II reducido puede ahora reducir al sustrato.

Los reductantes fisiológicamente funcionales incluyen principalmente a la ferredoxina y en otros microorganismos, la flavodoxina.

Existen evidencias (94) que indican que el ATP es requerido para la transferencia de electrones y no para la reducción de sustratos (la nitrogenasa puede reducir):



Ciclopropeno \longrightarrow Ciclopropano.etc.(97).

Y que la nitrogenasa reductasa se disocia de la nitrogenasa después de cada electron que se transfiere, fenómeno que es acompañado por la hidrólisis de ATP (94).

Otro papel que desempeña el ATP, es el implicado con el establecimiento de interacciones heterotrópicas (MgATP-MgADP) con el complejo de la nitrogenasa para el control de la reducción de sustrato, la estrecha unión MgADP a la nitrogenasa en comparación con la del complejo MgATP, asegura una rápida inhibición de la reducción del sustrato por una pequeña disminución de la relación-

MgATP : MgADP, la débil unión del complejo MgATP a la nitrogenasa - presumiblemente facilita el selectivo control del costoso sistema- (en términos de exigencia de ATP) de la nitrogenasa, a la vez que - permite que otras enzimas dependientes de ATP continúen funcionando. (107).

El esquema para el mecanismo de catálisis de la nitrogenasa es el siguiente:

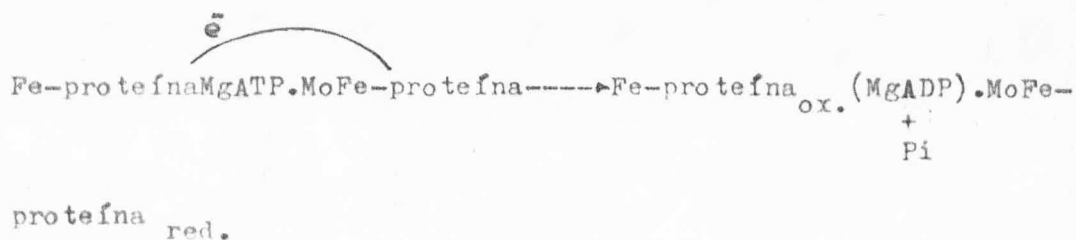
1.- Reducción de la Fe-proteína por un donador de electrones.



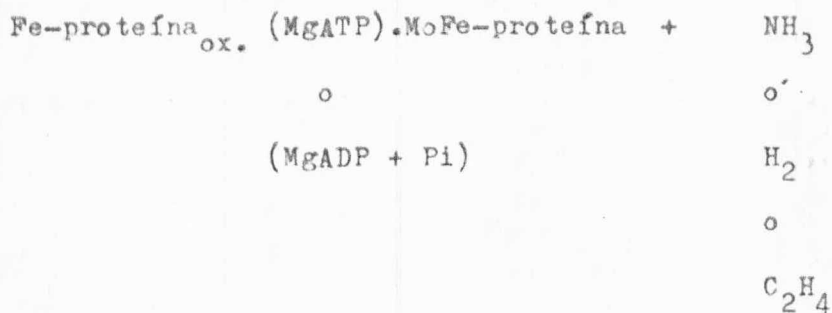
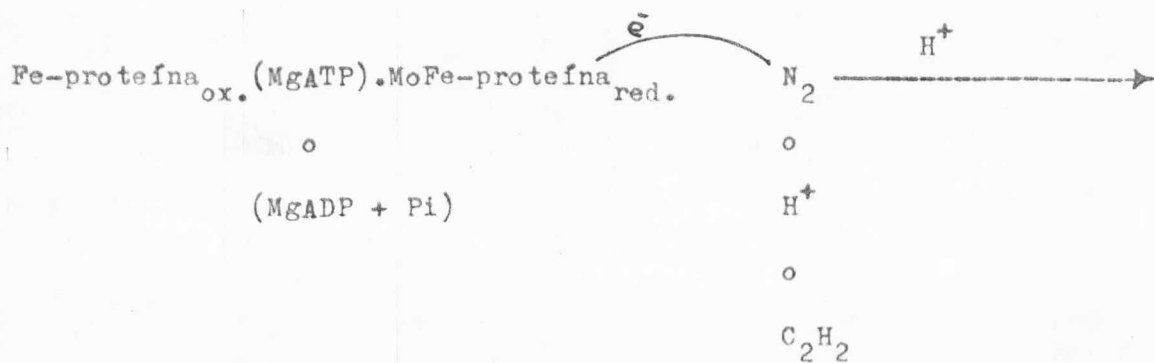
2.- Ensamble de un complejo que contiene ambas proteínas (Fe-proteína y MoFe-proteína) y MgATP.



3.- La transferencia del electrón de la Fe-proteína a la - MoFe-proteína acoplada a la hidrólisis de ATP.



4.-Transferencia de electrones hacia las sustancias reducibles.



(Ref.107).

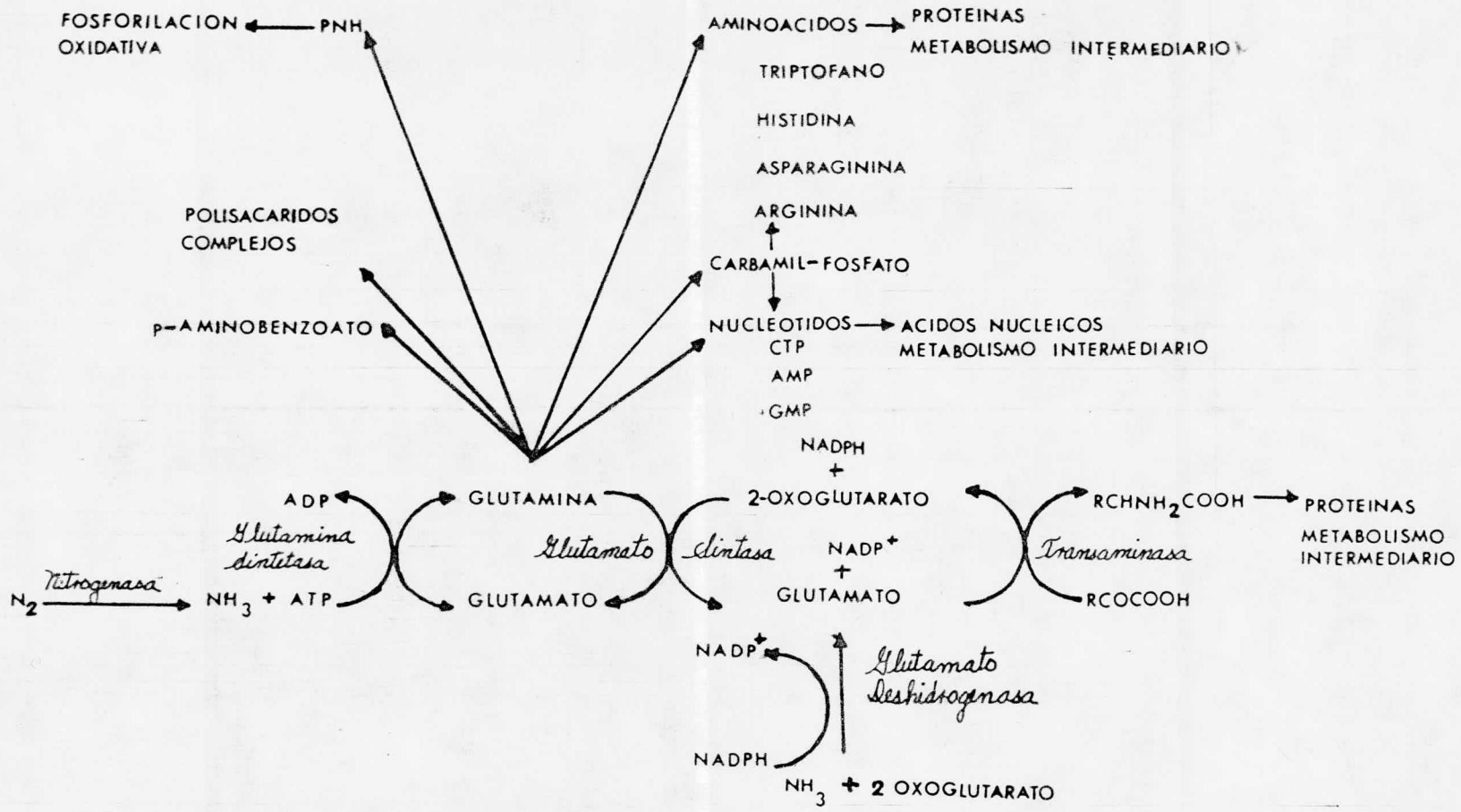
5.2.6.- ASIMILACION DE NITROGENO ATMOSFERICO.

Al adicionar ^{13}N a filamentos intactos de A.cylindrica por un periodo de 120 seg y analizar el extracto del cultivo por electroforésis de alto voltaje en capa delgada, el flujo de la marca fue: - de N_2 a amonio, de amonio al grupo amido de la glutamina, luego al grupo alfa amino del glutamato y posteriormente a otros aminoácidos.-- (98). Cuando se adicionó un inhibidor de la glutamino sintetasa (metionina sulfoximina), unicamente se marcó el NH_4^+ , y al adicionar azaserina (inhibidor de la glutamina-oxoglutarato amido transferasa), la marca se acumuló en la glutamina. (98).

Estos resultados son consistentes con la asimilación del amonio via: glutamino sintetasa/glutamino-oxoglutarato amido transferasa.

La glutamino sintetasa tiene un doble papel en bacterias fijadoras de nitrógeno, uno de ellos, la incorporación de NH_4^+ a glutamato, - este proceso está regulado por la deadenilación de la glutamino sintetasa, reacción que la transforma en un regulador positivo del operon de los genes nif.

Esta enzima ha sido estudiada en extractos crudos de Anabaena -



174A

FIG. 6.

así como purificada de los mismos (82)(101)(102). Sin embargo no -
existen evidencias de que la enzima sea adenilada en cianobacterias.
(103).

Los últimos estudios (101)(108) sugieren que in vivo, los nive -
les intracelulares de cationes divalentes (Mg^{++} , Co^{++}), la intensidad -
de luz e inhibidores por retroalimentación (AMP, CTP, carbamil fosfato-
triptofano), tienen un papel dominante en la regulación de la activi -
dad de la glutamino sintetasa y en consecuencia en la asimilación -
de amonio y la fijación de nitrógeno.

CAPITULO 6

PARTE EXPERIMENTAL

- 1.-Se sometieron cianobacterias a cantidades crecientes de antibiótico.
- 2.-Evaluación cualitativa de la actividad de nitrogenasa de cianobacterias no tratadas con antibiótico y tratadas con antibiótico.

MATERIALES Y METODOS

6.1.-

CIANOBACTERIAS

Para efectuar este trabajo, se utilizaron las Cianobacterias Ana -
baena sp y Nostoc sp. Donadas por el Dr. Greff del Limnology Department -
.University of Wisconsin. Madison, Wis. USA.

6.2.-

MATERIAL DE VIDRIO

Todo el material de vidrio empleado para los experimentos fue -
lavado con detergente y enjuagado con agua desionizada.

6.3.-

APARATOS

Se utilizaron: Campana de flujo laminar "Hitachi"
Espectrofotómetro "Carl Zeiss PM Q II"
Cromatógrafo de gases "Varian aerograph series 2700"
Graficador "Varian A-25"
Columna: DEGS (Dietilenglicolsuccinato) 20% sobre Chro
mosorb W, AW, DCMS. 80/100 3.5 m x 1/8 in (acero inoxidable.)

Microscopio de luz "Olympus"

Detector: Ionización de flama.

Autoclave.

Homogeinizador "Potter"

Equipo para filtración "MILLIPORE" (Utilizando membranas de 0.2 μ)

Centrífuga clinica.

6.4.-

REACTIVOS

Los reactivos empleados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las casas comerciales: Merck y J.T. Baker. La Actinomicina-D fue adquirida de Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. USA., Acetileno, Etileno y Nitrógeno de AGA de México, SA de CV. El Helio de Newtown - Industries Inc. Island City, N.Y. y el Hidrógeno para el detector - fue generado por medio de un hidrogenador "Varian".

6.5

ESTERILIZACION DEL MATERIAL

El material, y el medio de cultivo empleado para efectuar el -

crecimiento de las cianobacterias fue esterilizado en autoclave - durante 15 min a 121°. La Acinomicina -D se esterilizó mediante - filtración en un equipo "MILLIPORE" empleando: Malla de Nylon, prefiltro y membrana de 0.2 .

6.6.-

MEDIO DE CULTIVO

CONCENTRACION FINAL.

NaNO_3	$5.58 \times 10^{-3} \text{ M}$
K_2HPO_4	$1.55 \times 10^{-4} \text{ M}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$3.04 \times 10^{-4} \text{ M}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1.83 \times 10^{-4} \text{ M}$
$\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$2.22 \times 10^{-4} \text{ M}$
NaCO_3	$1.88 \times 10^{-4} \text{ M}$

Calentar hasta disolución la mezcla:

Citrato férrico	$9.80 \times 10^{-6} \text{ M}$
Ac. cítrico	$1.82 \times 10^{-5} \text{ M}$
EDTA. sal disódica	$6.00 \times 10^{-7} \text{ M}$

y adicionar 0.1 ml a un litro de medio.

Mezclar hasta disolución:

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1.00 \times 10^{-5} \text{ M}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$4.00 \times 10^{-6} \text{ M}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1.00 \times 10^{-6} \text{ M}$

y adicionar 0.1 ml a un litro de medio.

Mezclar hasta disolución:

KCl	$9.90 \times 10^{-5} \text{ M}$
H_3BO_3	$5.00 \times 10^{-5} \text{ M}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$4.00 \times 10^{-7} \text{ M}$

y adicionar 0.1 ml a un litro de medio.

CoCl_2	$1.76 \times 10^{-8} \text{ M}$
-----------------	---------------------------------

P^{H} : intervalo (9.00-9.50)



6.7.- CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Iluminación : continua (sin fotoperiodo)

Temperatura : ambiente (10° - 28°)

Para la determinación de la actividad de nitrogenasa se suprimió -
del medio de cultivo el NaNO_3 .

6.8.- EVALUACION DEL CRECIMIENTO

Determinación de clorofila (a):

La ecuación que se empleó para cuantificar clorofila (a) en -
extractos acetónicos de los cultivos.(mezcla acetona:agua 80:20)-
fue:

$$11.63(A_{665}) - 2.39(A_{649}) = \mu\text{g de clorofila (a) / ml (104)} .$$

Procedimiento:

10 ml de la suspensión del cultivo se someten a -

centrifugación en un tubo cónico de vidrio de 15 ml, se elimina el sobrenadante y al sedimento se le adiciona 10 ml de la mezcla acetona : agua, se homogeneiza durante 90 seg, se somete a centrifugación y se lee la absorción a 665 y a 649 nm en una celda de 1 cm de paso de luz .(104).

Número de células (cámara de Neubauer)

- Procedimiento:
- a).-se hace una dilución 1:200 con pipeta de Thoma.
 - b).-Se llena la cámara y se cuentan las células existentes en 5 cuadros pequeños.

Cálculos:

- Datos:
- a).-Superficie de 80 cuadros pequeños:
 $(80)(0.0025 \text{ mm}^2) = 0.2 \text{ mm}^2$
 - b).-Volumen de 80 cuadros pequeños:
 $(80)(0.0025 \text{ mm}^2)(0.1 \text{ mm}) = 0.02 \text{ mm}^3$
 - c).-Dilución (1:200)
 - d).- R = Número de células contadas en 5 cuadros pequeños.

Ecuación:

$$(R)(200)\left(\frac{1}{0.02}\right) = R(200)(50) = 10,000 (R) = \text{Núm. cel/ml.}$$

6.9.-

CURVAS DE CRECIMIENTO

(Cianobacterias no tratadas con antibiótico)

Se cultivaron Anabaena sp y Nostoc sp en matraces de 500 ml - (matraz de fondo plano) con un volumen de 250 ml de medio y 10 - ml de inóculo, se procedió a determinar su densidad celular y la - concentración de clorofila (a) con respecto al tiempo. (días).

6.10.-

CURVAS DE CRECIMIENTO

(Cianobacterias previamente tratadas con antibiótico)

Se cultivaron en las mismas condiciones que las no tratadas - Pero, las características del inóculo fueron:

Para Anabaena sp : 10 días en un medio con una concentración fi - nal de Actinomicina-D = $0.4 \mu\text{g/ml}$ adicionada en fase exponencial; - clorofila = $10.52 \mu\text{g/ml}$.

Para Nostoc sp : 10 días en un medio de cultivo con una concentra - ción final de Actinomicina -D = $0.45 \mu\text{g/ml}$ adicionada en fase expo - nencial; clorofila = $5.45 \mu\text{g/ml}$.

6.11.- TRATAMIENTO CON ANTIBIOTICO

Para Nostoc sp

Volumen matraz: 125 ml (Erlenmeyer)

Volumen de medio: 50 ml (medio con NaNO_3)

Pasos.	Clorofila al adicionar antibiótico μ g/ml	Conc. Anti- biótico. μ g/ml	días de crecimiento con el anti biótico.	Observaciones.
1.-				Inóculo procedente de un cultivo en fase estacionaria; clorofila = $4.59 \mu\text{g/ml}$
2.-	4.38	0.41	4	Clorofila al pasar a medio fresco: $4.23 \mu\text{g/ml}$
3.-	3.36	4.1	4	Clorofila al pasar a medio fresco: $1.6 \mu\text{g/ml}$
4.-	4.75	4.1	1	Estos cultivos perdieron sus pigmentos al 7 ^o día de permanencia en medio fresco, recuperándolos hasta el 16 ^o ; se les determinó actividad de nitrogenasa.

6.12

TRATAMIENTO CON ANTIBIOTICO

Para Anabaena sp

Volumen matraz: 125 ml (Erlenmeyer)

Volumen del medio: 50 ml (medio con NaNO_3)

Pasos.	Clorofila al adicionar antibiótico $\mu\text{g/ml}$	Conc. Antibió- tico. $\mu\text{g/ml}$	Dias de crecimiento con el anti- biótico	Observaciones-
1.-				Inóculo procedente de un cultivo en- fase estacionaria: clorofila = $10.74 \mu\text{g/ml}$
2.-	6.64	0.38	4	clorofila al mo - mento de pasar a - medio fresco: $3.63 \mu\text{g/ml}$
3.-	2.88	2.5	5	Estos cultivos - perdieron sus - pigmentos al 7 ^o dia de permanencia - en medio fresco, recu- perándolos el - 16 ^o dia. Se les - determinó acti- vidad de nitro- genasa.

6.13.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE NITROGENASA

Procedimiento:

(ref.105)

Preparación de la muestra:

Con una jeringa de 50 ml, se colocaron 20 ml de la suspensión de cianobacterias en frascos viales de 50 ml provistos de tapón de hule y sello de aluminio, conectandose (2 frascos) en un sistema de aereación que a continuación se describe:

Longitud: 48 cm

Diámetro: 3 cm (interno)

Al extremo una llave de paso que conecta a la bomba de vacío, y a lo largo 5 conexiones de vidrio con una longitud de 6.0 cm y un diámetro de 0.7 cm distribuidas cada 9 cm que comunican al sistema con: Helio, Acetileno, manómetro de Mercurio y los 2 frascos viales conteniendo las cianobacterias.

Una vez instalado el sistema anteriormente descrito se sometía a vacío (100 torr) por 60 seg, la presión atmosférica se restablecía con helio (esta operación se repetía 3 veces), pero en la última se ajustaba a la presión atmosférica con una presión parcial-

de 200 torr de acetileno y el resto (286 torr con helio),

Condiciones de operación

Temperatura de la columna : 40°

Gas acarreador: Nitrógeno (flujo:30 ml/min)

Detector: Ionización de flama (Hidrógeno 30 ml/min ; aire 300 ml/min)

Electrómetro: 10^{-9} A/mV , 10^{-10} A/mV.

Velocidad del papel: 0.25 in/min

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente (25-27°), bajo iluminación, se inyectaron muestras de 5 μ l con una jeringa de 10 μ l - a diferentes tiempos.

El blanco: inyección de aire, el control: sistema con cianobacterias - pero sin acetileno.

Cálculos:

El método más fácil es la normalización de áreas, no requiere calibración y se usa para una determinación rápida de la composición aproximada. (106).

Etapas del cálculo:

- 1.- Sumar las áreas.
- 2.- Expresar cada área de pico como un porcentaje del total.
- 3.- Establecer que el % de área es el mismo que el % de composición.

Para este caso:

$(\text{Área del etileno} / \text{área del acetileno}) \times 100 = \% \text{ de conversión.}$

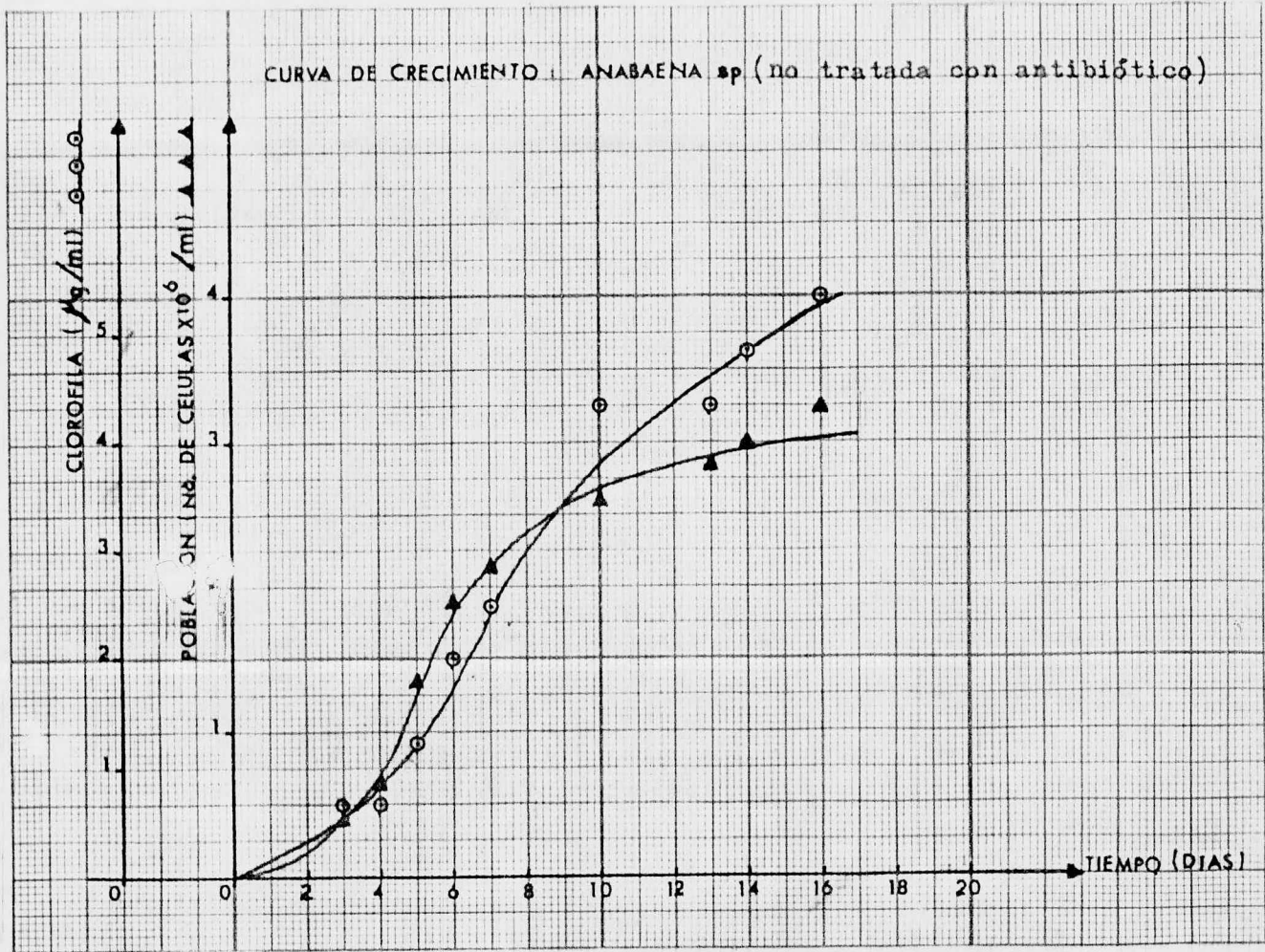
7.1.-

Curva de crecimiento

Anabaena sp (no tratada con antibiótico)

Día.-	Clorofila (μ g/ml)	Células/ml $\times 10^6$
0.-	0.0097	
3.-	0.57	0.38
4.-	0.57	0.56
5.-	1.26	1.36
6.-	2.02	1.88
7.-	2.49	2.09
10.-	4.31	2.66
13.-	4.34	2.80
14.-	4.86	3.07
17.-	5.42	3.22

Gráfica Núm. 1 .-



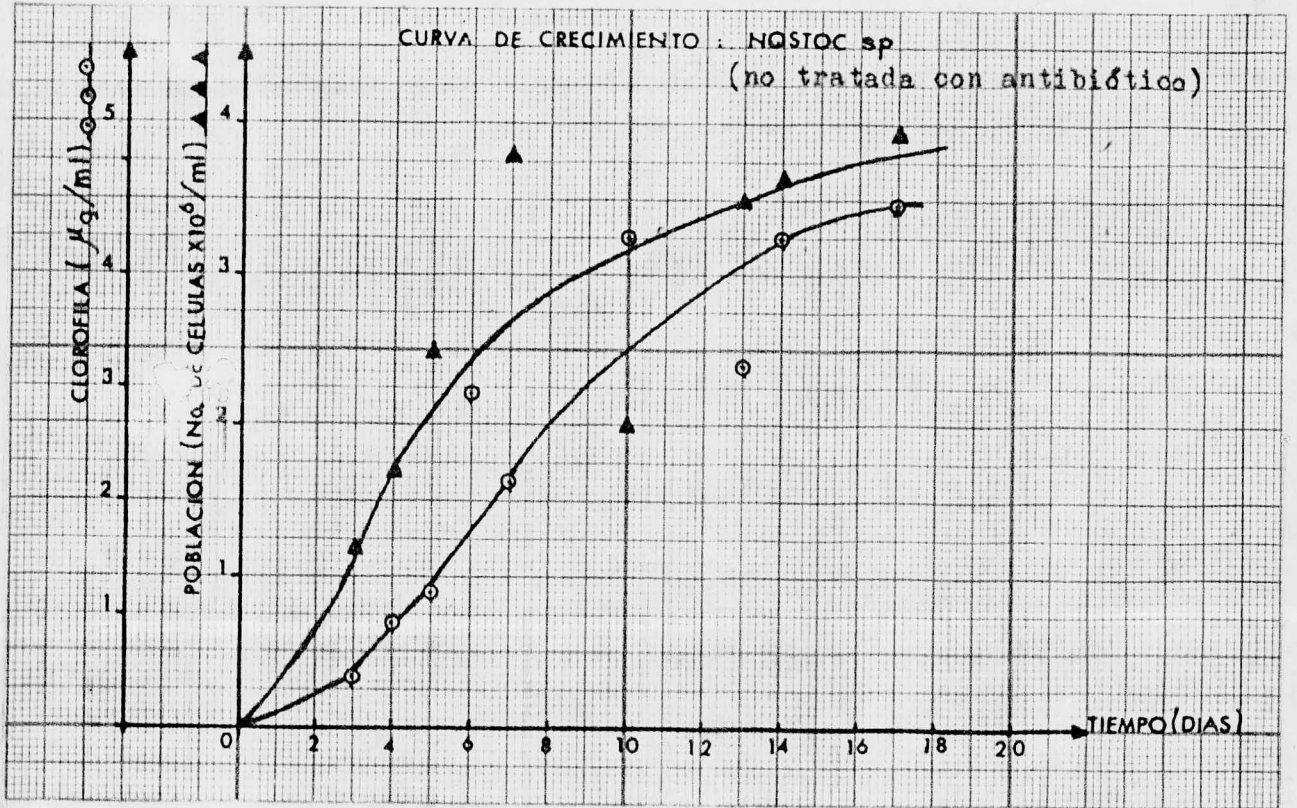
7.2.-

Curva de crecimiento

Nostoc: sp (no tratada con antibiótico).

Día.-	Clorofila (μ g/ml)	Células/ml x 10^6
0.-	0.0067	
3.-	0.42	1.22
4.-	0.89	1.71
5.-	1.14	2.53
6.-	2.95	3.75
7.-	2.12	2.07
10.-	4.37	3.45
13.-	3.27	3.11
14.-	4.35	3.58
17.-	4.69	3.97

Gráfica Núm.2 .-



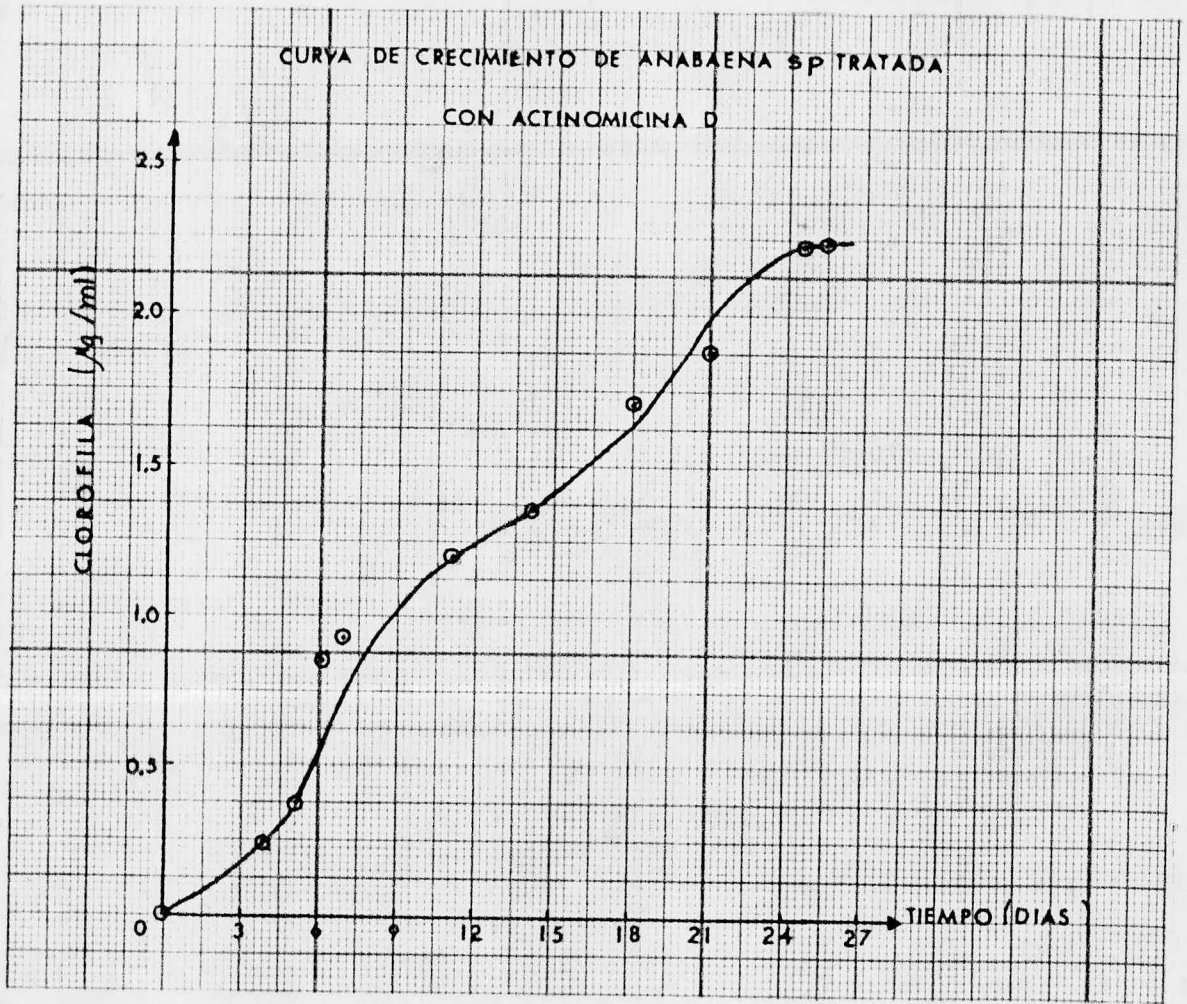
7.3.-

Curva de crecimiento

Anabaena sp (tratada con antibiótico)

Día.-	Clorofila g /ml
0	0.001
4	0.23
5	0.37
6	0.86
7	0.91
11	1.20
14	1.35
18	1.52
21	1.88
25	2.30
26	2.33

Gráfica Núm.3



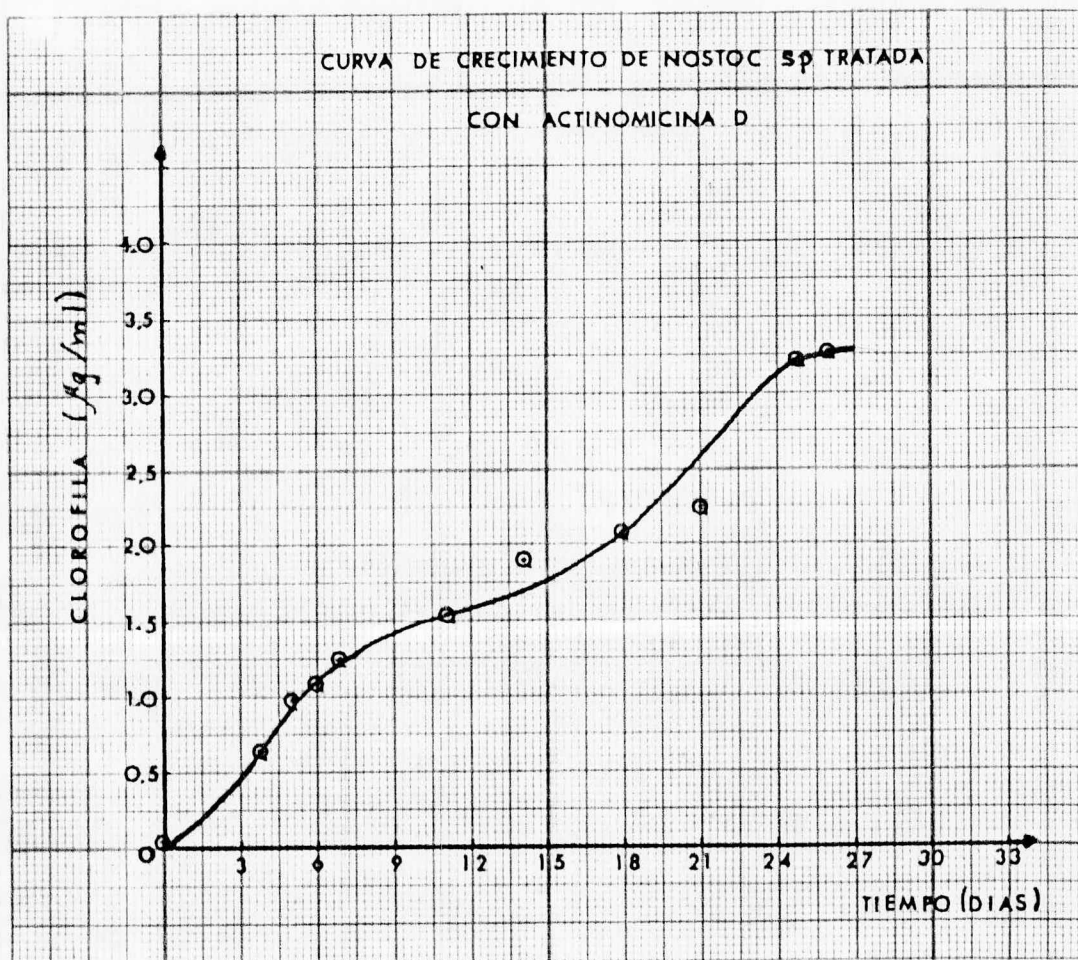
7.4.-

Curva de crecimiento

Nostoc sp (tratada con antibiótico)

Dia	Clorofila g/ml
0	0.0017
4	0.66
5	0.98
6	1.09
7	1.23
11	1.54
14	1.89
18	2.10
21	2.25
25	3.23
26	3.27

Gráfica Núm. 4



7.5.- DETERMINACION DE NITROGENASA.

Clorofila (g/ml)	tiempo de incubación (min) rango.	área etileno (mm ²) rango.	área acetileno (mm ²) rango .	actividad de - nitrogenasa - (% de conver - sión prome - dio).
Anabaena N. 0.97	18-25	0.5	172-187	0.0027
Anabaena T. 1.30	22-28	0.125	94-103	0.00063
Nostoc N . 1.90	10-22	1-1.5	179-218	0.0062
Nostoc T 1.63	10-20	0.75	141-144	0.0026

N= Normal (no tratada con antibiótico)

T= Tratada (tratada con antibiótico)

CONCLUSIONES

De los resultados preliminares reportados en este trabajo pueden derivar las siguientes conclusiones:

- 1.- La adición de actinomicina-D a los cultivos de *Anabaena* sp y *Nostoc*-sp a las concentraciones usadas en estos experimentos, afectan su patrón de crecimiento, haciendo más lento su desarrollo.
- 2.- Las adiciones secuenciales de antibiótico no bloquean la actividad de nitrogenasa, ya que las cianobacterias son capaces de crecer en medio sin nitrógeno combinado (NaNO_3), además se puede detectar producción de etileno en el sistema después del tratamiento con el antibiótico.
- 3.- Las cianobacterias recuperadas después del tratamiento con antibiótico y de la etapa de pérdida de clorofila, parecen ser resistentes a actinomicina-D, puesto que pueden crecer en presencia de: $2.5 \mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo (*Anabaena* sp) y $4.1 \mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo (*Nostoc* sp), sin embargo es necesario realizar otros experimentos para confirmar si efectivamente son resistentes a actinomicina-D, fundamentalmente, estudiar el efecto del antibiótico sobre inóculos tomados en diferentes etapas del crecimiento.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.-Ledoux,L.,Huart,R.1969.Fate of exogenous bacterial deoxyribo - nucleic acids in barley seedling.J.Mol.Biol.43:243-262 .
- 2.-Bendich,A.J.,Filner,P.1971. Uptake of exogenous DNA by pea - seedlings and tobacco cells. Mutat.Res. 13:199-214 .
- 3.- Kado,C.I.,Lurquin,P.F. 1975.Studies on Agrobacterium tumefaciens. IV.Nonreplication of the bacterial DNA in mung bean (Phaseolus aureus).Biochem.Biophys.Res.Commun.64:175-183 .
- 4.- Kleinhofs,A.,Behki,R.1977.Prospects for plant genome modifica - tion by nonconventional methods.Ann.Rev.Genet.11:79-101.
- 5.- Thomas,E.,Davey,M.R. From single cells to plants.pág.76-79 - Wykeham Publications.1975 .London y Winchester.
- 6.- Carlson,P.S. 1973.The use of protoplast for genetic research - Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70:598-602.
- 7.- Kung,S.D.,Gray,J.C.,Wildman,S.G.,Carlson,P.S. 1975.Polypepti - de composition of fraction I protein from parasexual hybrid - plants in the genus Nicotiana. Science.187:353-355.
- 8.- Chan,P.H.,Wildman,S.G. 1972 . Chloroplast DNA codes for the - primary structure of the large subunit of fraction I protein.- Biochim.Biophys.Acta 277:677-680.

- 9.- Kawashima, N., Wildman, S.G. 1972. Studies on fraction I protein. IV - mode of inheritance of primary structure in relation to whether chloroplast or nuclear DNA contains the code for a chloroplast protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 262:42-49 .
- 10.- Bonnett, H., Eriksson, T. 1974. Transfer of algal chloroplast into protoplasts of higher plants. *Planta.* 120:71-79 .
- 11.- Bonnett, H.T. 1976. On the mechanism of the uptake of Vaucheria - Chloroplasts by carrot protoplasts with polyethylene glycol. - *Planta* 131:229-33 .
- 12.- Davey, M.R., Cocking, E.C. 1972 . Uptake of bacteria by isolated - plant protoplasts . *Nature* 239:455-456 .
- 13.- Hollaender, A. Genetic engineering for nitrogen fixation. pág. - 213-229. Plenum Press. 1977. New York and London .
- 14.- Giles, K.L., Whittenhead, H. 1976. Uptake and continued metabolic activity of azotobacter within fungal protoplasts. *Nature* 193 :1125-1126 .
- 15.- Street, H.E. Plant tissue and cell culture. pág. 103-135. Blackwell - Scientific publications. 1977. Oxford, London, Adinburgh, Melbourne.
- 16.- Cocking, E.C. 1972. Plant cell protoplast - isolation and development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23:29-50 .

- 17.- Carlson, P.S., Smith, H.H., Dearing, R.D. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2292-94 .
- 18.- Kao, K.N., Michayluk, M.R. 1974. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115:355-67 .
- 19.- Ahkong, Q.F., Howell, J.I., Lucy, J.A., Safwat, F., Davey, M.R., Cocking - E.C. 1975. Fusion of hen erythrocytes with yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. *Nature* 255:66-67 .
- 20.- Jones, C.W., Mastrangelo, I.A., Smith, H.H., Liu, H.Z., Meck, R.A. 1976 - Interkingdom fusion between human (HeLa) cells and tobacco hybrid (OGLL) protoplasts. *Science* 193: 401-3 .
- 21.- Schaffer, P., Cami, B., Hotchkiss, R.D. 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73:2151-55 .
- 22.- Smith, H.H., Kao, K.N., Combatti, N.C. 1976. Interspecific hybridization by protoplasts fusion in *Nicotiana*. Confirmation and extension. - *J. Hered.* 67:123-128 .
- 23.- Melchers, G., Labid, G. 1974. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrid of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. *Mol. Gen. Genet.* - 135:277-94 .

- 24.- Power, J.B., Frearson, E.M., Hayward, C., George, D., Evans, P.K., -
Berry, S.F., Cocking, E.C. 1976. Somatic hybridisation of Petunia -
hybrida and P. parodii. Nature 263:500-2 .
- 25.- Kung, S.D., Gray, J.C., Wildman, S.G., Carlson, P.S. 1975. Polypepti -
de composition of fraction I protein from parasexual hybrid -
plants in the genus Nicotiana . Science 187:353-55 .
- 26.- Sacristán, M.D., Melchers, G. 1969. The caryological analysis of -
plants regenerated from tumorous and other callus cultures of -
tobacco. Mol. Gen. Genet. 105:317-33.
- 27.- Melchers, G., Labid, G. 1974. Somatic hybridization of plants by fu -
sion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrid of -
"haploid" light sensitive varieties of tobacco. Mol. Gen. Genet. -
135:277-94 .
- 27a.- Leber, B., Hemleben, V. 1979. Uptake of homologous DNA into nuclei of -
seedlings and by isolated nuclei of a higher plant. Z. pflanzenphy -
siol. Bd. 305-316.
- 27b.- Jain, S.C., Sobell, H. 1972. Stereochemistry of actinomycin binding to -
DNA. J. Mol. Biol. 68:1-20.
- 27c.- Foor, F., Magasanik, B. 1975. Regulation of synthesis of glutamine synthe -
tase by adenylylated glutamine synthetase. PNAS. 72:4844-4848.

- 28.- Davison, B.E. 1971. The alignments of cyanogen bromide fragments from the flagellin of Salmonella adelaide. Eur.J.Biochem. 18:524-29.
- 29.- Constabel, F., Dudits, D., Gamburg, O.L., Kao, K.N. 1975. Nuclear fusion in intergeneric heterokaryons. A note. Can.J.Bot. 53:2093-95 .
- 30.- Power, J.B., Frearson, E.M., Hayward, C., Cocking, E.C. 1975. Some consequences of the fusion and selective culture of petunia and parthenocissus protoplasts. Plant.Sci.Lett. 5:197-207 .
- 31.- Kao, K.N. 1977. Chromosomal behavior in somatic hybrids in soybean-N.glauca. Mol.Gen.Genet. 150:231-35 .
- 32.- Wetter, L.R. 1977. Isoenzyme patterns in soybean-Nicotiana somatic hybrids. Mol.Gen.Genet. 150:231-35.
- 33.- Kumar, H.D. 1964b. Streptomycin- and penicillin-induced inhibition of growth and pigment production in blue-green algae and production of strains of Anacystis nidulans resistant to these antibiotics. Journal of Experimental Botany 15: 232-250 .
- 34.- Kumar, H.D. 1962. Apparent genetic recombination in a blue-green alga. Nature 196:1121-1122 .

- 35.- Kumar, H.D. 1964a. Effects of radiations on blue-green algae. II - Effects on growth. *Annals of Botany* 28:555-564 .
- 36.- Ladha, J.K., Kumar, H.D. 1978 . Genetics of blue-Green algae- 53:355-386.
- 37.- Gulati, S., Kumar, H.D. 1970 . Action of mutagenic chemicals on - Anacystis nidulans. V. Diethyl sulphate. *Archiv für Mikrobiologie* - 70:313-329.
- 38.- Luria, S.E., Delbruck, H. 1943. Mutations of bacteria from virus - sensitivity to virus resistance . *Genetics*. 28:491-511 .
- 39.- Van Baalen, C. 1965a. Quantitative surface plating of coccoid blue-green algae. *Journal of Phycology* I, 19-22 .
- 40.- Davies Julian., Smith, D.I. 1978.- Plasmid-determined resistance - to antimicrobial agents. *Ann. Rev. Microbiol.* 32:469-518.
- 41.- Melinshi, D.R., 1973. Plasmid determined resistance to antibiotics: Molecular properties of R factors. *Ann. Rev. Microbiol.* - 27:437-469.
- 42.- Van Den Hondel, C.A.M.J.J., Keegstra, W., Borrias, W.E., Van Arkel-G.A. 1979. Homology of plasmids in strains of unicellular cyanobacteria. *Plasmid* 2, 323-333 .

- 43.- Goldberg, I.H., Friedman, P.A. 1971. Antibiotics and nucleic acids. *Ann. Rev. Biochem.* 40:775-809.
- 44.- Schabert, K.R., Evans, H.J. 1976. Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73:1207-1211.
- 45.- Brill, W.J. 1975. Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* 29:109-129.
- 46.- Wilcox, M., Mitchison, G.J., Smith, R.J. 1973. Pattern formation in the blue-green alga *Anabaena* II. Controlled proheterocyst regression. *J. Cell Sci.* 13:637-49.
- 47.- Lambein, F., Wolk, C.P. 1973. Structural studies on the glycolipids from the envelope of the heterocyst of *Anabaena cylindrica* - *Biochemistry*: -12:791-98.
- 48.- Bryce, T.A., Welti, D., Walsby, A.E., Nichols, B.W. 1972. Monohexoside derivatives of long chain polyhydroxy alcohols; a novel class of glycolipid specific to heterocystous algae. *Phytochemistry* - 11:295-302.
- 49.- Walsby, A.E., Nichols, B.W. 1969. Lipid composition of heterocysts. *Nature* 221: 673-74.

- 50.- Winkenbach, F., Wolk, C.P., Jost, M. 1972. Lipids of membranes and of the cell envelope in heterocysts of a blue-green alga.- *planta* 107: 69-80.
- 51.- Fay, P. 1973. The Heterocyst. In the biology of blue-green algae.- ed. N.G. Carr, B.A. Whitton, pp 238-59. Oxford: Blackwell .
- 52.- Simon, R.D. 1971. Cyanophycin granules from the blue-green alga- Anabaena cylindrica: a reserve material consisting of copoly- mers of aspartic acid and arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*- 68:265-67.
- 53.- Thomas, J. 1970. Absence of pigments of photosystem II of photo- synthesis in heterocysts of a blue-green alga. *Nature* 258:715- 16 .
- 54.- Kulasooriya, S.A.; Lang, N.J., Fay, P. 1972. The heterocysts of blue - green algae III. Differentiation and nitrogenase activity. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 181:199-209.
- 55.- Fay, P. Stewart, W.D.P., Walsby, A.E., Fogg, G.E. 1968. Is the heterocyst- the site of nitrogen fixation in blue-green algae? *Nature* 220: - 810-12.
- 56.- Fleming, H. Haselkorn, R. 1973. Differentiation in *Nostoc musco- rum*: Nitrogenase is synthesized in heterocysts. *Proc. Nat. Acad. - Sci. USA.* 70: 2727-2731.

- 57.- MacNeil, T., MacNeil, D., Roberts, G., Supiano, M.A., Brill, W.J. 1978-
Fine-structure mapping and complementation analysis of nif -
(nitrogen fixation) genes in Klebsiella pneumoniae. J. of Bacte -
riology. 136:253-266.
- 58.- Roberts, G.P., MacNeil, T., MacNeil, D., Brill, W.J. 1978. Regulation-
and characterization of protein products coded by the nif -
(Nitrogen fixation) genes of Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriolo -
gy. 136:267-279.
- 59.- Eady, R.R., B.E. Smith, K.A. Cook, and J.R. Postgate. 1972. Nitrogenase -
of Klebsiella pneumoniae purification and properties of the com -
ponent proteins . Biochem. J. 128: 655-675.
- 60.- Robson, R.L., 1979. O₂-Repression of nitrogenase synthesis in -
A. chroococcum . FEMS Microbiology Letters 5: 259-262.
- 61.- Pye, E.K., Weetall, H.H. Enzyme Engineering. pag. 193-205. Plenum -
Press. 1978. New York and London.

- 62.- Haselkorn, R. 1978. Heterocysts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29:319-44 -
- 63.- Bradley, S., Carr, N.G. 1976. Heterocyst and nitrogenase development in Anabaena cylindrica. *J. Gen. Microbiol.* 96:175-84 .
- 64.- Neilson, A., Rippka, R., Kunisawa, R. 1971. Heterocist formation and nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp.: a kinetic study -
m *Arch. Mikrobiol.* 76:139-50.
- 65.- Thomas, J. 1972. Relationship between age of culture and occurrence of the pigments of photosystem II of photosynthesis in heterocysts of blue-green alga. *J. Bacteriol.* 110:92-95 .
- 66.- Fay, P. 1969. Cell differentiation and pigment composition in -
Anabaena cylindrica. *Arch. Mikrobiol.* 67:62-70.
- 67.- Wolk, C.P., Simon, R.D. 1969. Pigments and lipids of heterocysts. -
Planta 86:92-97.
- 68.- Fleming, H., Haselkorn, R. 1974. The program of protein synthesis during heterocist differentiation in nitrogen-fixing blue-green algae. *Cell* 3:159-70 .
- 69.- Foulds, I.J., Carr, N.G. 1977. A proteolytic enzyme degrading phycocyanin in cyanobacterium Anabaena cylindrica. *FEMS Microbiol. Lett.* 2:117-21 .

- 70.- Wood, N.B., Haselkorn, R. 1977. Protein degradation during hetero -
cyst differentiation in the blue-green alga *Anabaena* 7120 -
Fed. Proc. 36:886 .
- 71.- Tel-Or, E., Stewart, W.D.P. 1975. Manganese and photosynthetic oxy-
gen evolution by algae. *Nature* 258:715-16 .
- 72.- Tel-Or, E., Stewart, W.D.P. 1977 . Photosynthetic components and -
activities of nitrogen-fixing isolated heterocysts of *Anabaena-*
cylindrica. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 198:61-86 .
- 73.- Gregory, R.P.F. *Biochemistry of photosynthesis* . págs. 132-144 -
segunda edición. John Wiley and Sons LTD . Londres . 1977 .
- 74.- Alberte, R.S., Tel-Or, E. 1977. Characteristic of the photosynthe -
tic apparatus of heterocyst and vegetative cells of *Nostoc* -
and *Anabaena* . *Plant Physiol.* 59:129 .
- 75.- Donge, M., Haveman, J., Schiereck, P. 1972. Absence of photosystem -
II in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. *Biochim. Biophys-*
Acta. 256:157-61 .
- 76.- Lee, S.S., Young, A.M., Krogmann, D.W. 1969. Site specific inactiva -
tion of the photophosphorylation reactions of *Anabaena varia* -
bilis. *Biochim Biophys. Acta* 180:130-36 .

- 77.- Tel-Or, E., Stewart, W.D.P. 1976. Photosynthetic electron transport, ATP synthesis and nitrogenase activity in isolated heterocysts of Anabaena cylindrica. Biochim. Biophys. Acta. - 423:189-95 .
- 78.- Cox, R.M., Fay, P. 1969. Special aspects of nitrogen fixation by blue-green algae. Proc. R. Soc. London Ser. B. 172:357-66 .
- 79.- Fay, P. 1970. Photostimulation of nitrogen fixation in Anabaena cylindrica. Biochim. Biophys. Acta. 216:353-56 .
- 80.- Lex, M., Stewart, W.D.P. 1973. Algal nitrogenase, reductant pools and photosystem I activity. Biochim. Biophys. Acta 292:436-43 .
- 81.- Barris, R.H. Nitrogen fixation. Plant Biochemistry. (Bonner, J. - y Varner, J.E. Editores). Capitulo 2 . págs. 887-907 .
Academic Press. E.U.A. (1976).
- 82.- Hallenbeck, P.C., Kostel, P.J., Benemann, J.R. 1979. Purification and properties of nitrogenase from the Cyanobacterium, Anabaena cylindrica . Eur. J. Biochem. 98:275-284 .

- 83.- Evans, M.C.W., Reeves, S.G., Telfer, A. 1973. The detection of a -
bound ferredoxin in the photosynthetic lamellae of blue-green-
algae and other oxygen-evolving photosynthetic organisms.-
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51:593-96.
- 84.- Hall, D.O., Cammack, R., Rao, K.K., Evans, M.C.W. Mullinger, R. 1975 .
Ferredoxins, blue-green bacteria, and evolution. Biochem. Soc. -
Trans. 3:361-68 .
- 85.- Cammack, R., Tel-Or, E., Stewart, W.D.P. 1977. EPR spectra of photo -
system I constituents in heterocyst preparations from Anabaena-
cylindrica. FEBS Lett. 70:241-44 .
- 86.- Wolk, C.P. 1968. Movement of carbon from vegetative cells to -
heterocysts in Anabaena cylindrica. J. Bacteriol. 96:2138-43.
- 87.- W.D.P. Stewart, A. Haystead, Pearson H.W. 1969.- Nitrogenase Acti-
vity in heterocysts of blue-green algae. Nature 224:226-228.
- 88.- Winkenbach, F., Wolk, C.P. 1973. Activities of enzymes of the oxi-
dative and the oxidative and the reductive pentose phosphate-
pathways in heterocysts of a blue-green alga. Plant Physiol.-
52:480-83 .

- 89.- Codd, G.A., Stewart, W.D.P. 1976.- Polyhedral bodies and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase of the blue-green alga Anabaena cylindrica *Planta* 130:323-326.
- 90.- Lex, M., Carr, N.G. 1974. The metabolism of glucose by heterocysts and vegetative cells of Anabaena cylindrica. *Arch. Mikrobiol.* 101:161-167 .
- 91.- Apte, S.K., Rowell, P., Stewart, W.D.P. 1978. Electron donation to ferredoxin in heterocysts of the N_2 -fixing alga Anabaena cylindrica. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 200, 1-25 .
- 92.- Smith, R.V., Noy, R.J., Evans, M.C.W. 1971. Physiological electron donor systems to the nitrogenase of the blue-green alga Anabaena cylindrica. *Biochim. Biophys. Acta.* 253:104-9.
- 93.- Codd, G.A., Rowell, P., Stewart, W.D.P. 1974. Pyruvate and nitrogenase activity in cell free extracts of the blue-green alga Anabaena cylindrica *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61:424-31.
- 94.- Hageman, R.V., Burris, R.H., 1978-Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:2699-2702.
- 95.- Shah, V.K., Chisnell, J.R., Brill, W.J., 1978. Acetylene reduction by the iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81:232-235.

- 96.- Bowden, F.L. The biochemical function of molybdenum. In Tech -
niques and topics in bioinorganic chemistry. (McAuliffe, C.-
A. Editor). Parte 3 .207-67 Te Mac Millan Press L.T.D.
Londres (1975).
- 97.- Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Stasny, J.T.; Parshall, G.W.-The nitro -
genase reaction. The Biochemistry of nitrogen fixation. Cap. 24.-
351-76 (Stewart W.D.P. Editor) Cambridge University Press. 1975.
- 98.- Wolk, C.P., Thomas, J., Shaffer, P.W., Austin, S.M., Galonsky, A. 1976-
Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ^{13}N -labeled-
by Anabaena cylindrica. J. Biol. Chem. 251:5027-34.
- 99.- Thomas, J., Meeks, J.C., Wolk, C.P., Shaffer, P.W., Austin, S.M., Chien-
W.S. 1977. Formation of glutamine from ^{13}N -ammonia, ^{13}N -dinitro-
gen, and ^{14}C -glutamate by heterocysts isolated from Anabaena -
cylindrica. J. Bacteriol. 129:1545-55.
- 100.- Strecher, S.L., Shanmugan, K.T., Ausubel, F., Morandi, C., Goldberg, R.B.
1974. Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae: -
evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator -
of nitrogenase synthesis. J. Bacteriol. 120:815-21.

- 101.- Stacey, G., Baalen, C. V., Tabita, R. 1979.- Nitrogen and ammonia - assimilation in the cyanobacteria: Regulation of glutamine - synthetase. Archives of Biochemistry and Biophysics 194:- 457-467.
- 102.- Dhondt, M. W. N., Haystead, A., Stewart, W. D. P. 1973. Glutamine- synthetase of nitrogen-fixing alga Anabaena cylindrica. Arch- Mikrobiol. 90:281-95.
- 103.- Stewart, W. D. P., Rowell, P. 1975. Effects of L-methionine-DL-sulfoximine on the assimilation of newly fixed NH_3 , acetylene - reduction and heterocyst production in Anabaena cylindrica. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65:846-56.
- 104.- Strain, H. H., y Svec, A. W. Extraction, Separation, Estimation, and- Isolation of the Chlorophylls (Vernon, P. L., and Seely, G. R. --- Editores). Cap. 2. págs. 21-65. Academic Press. EUA. 1966 .
- 105.- Dilworth, M. J., 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing pre- parations from Clostridium pasteurianum. Biochim. Biophys. Acta- 127:285-294.

- 106.- Stambuck, J.D. 1970.-Manual práctico de cromatografía de gases .-The Perkin-Elmer Corp. pág. 31
- 107.- Mortenson, L.E., Thorneley, R.N.F. 1979. Structure and function of nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* 48:387-418.
- 108.- Rowell, P. Sampaio, M.J.A.M., Ladha, J.K., Stewart, W.D.P. 1979. Alteration of cyanobacterial glutamine synthetase activity in vivo in response to light and NH_4^+ . *Arch. Microbiol.* 120:195-200.