



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**IDENTIFICACION, CLONACION Y MUTAGENESIS DEL
GEN ESTRUCTURAL PARA LA GLUTAMINO SINTETASA II
(glnT) DE Rhizobium phaseoli.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

MARINA IRENE WILD SANTAMARIA

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO



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.

IDENTIFICACION, CLONACION Y MUTAGENESIS DEL
GEN ESTRUCTURAL PARA LA GLUTAMINO SINTETASA II
(glnT) DE Rhizobium phaseoli.

TESIS

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO
MARINA IRENE WILD SANTAMARIA.

ABRIL, 1986.

A mis padres ...

con infinito cariño y respeto

INTRODUCCION

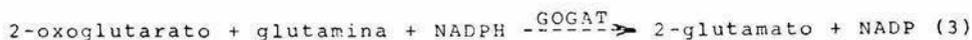
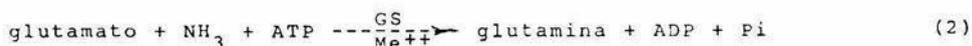
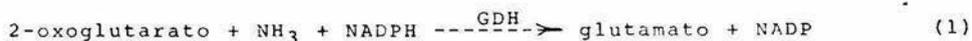
Fijación biológica de nitrógeno:

La fijación biológica de nitrógeno, que consiste en la conversión de nitrógeno atmosférico en amonio, es llevada a cabo por algunas bacterias y algas verde-azules. Las bacterias que fijan nitrógeno pueden hacerlo en vida libre y/o en simbiosis con organismos superiores.

Entre los microorganismos que fijan nitrógeno simbioticamente se encuentran las bacterias del género Rhizobiùm que se asocian con las raíces de algunas leguminosas formando estructuras especializadas llamadas nódulos. En los nódulos, estas bacterias se diferencian en bacteroides y utilizan el fotosintato proporcionado por la planta como fuente energética para la fijación de nitrógeno (1). El nitrógeno fijado en los bacteroides se exporta al citoplasma de la célula vegetal en forma de amonio donde es asimilado y utilizado en una variedad de rutas biosintéticas.

Asimilación de amonio en bacterias:

La asimilación de amonio en bacterias se lleva a cabo mediante la vía glutamato deshidrogenasa (GDH) (reacción 1) ó la glutamino sintetasa (GS)-glutamato sintasa (GOGAT) (reacciones 2 y 3) dependiendo del organismo y de la fuente nitrogenada (2).



La vía principal para la asimilación de amonio en bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre en condiciones de exceso de amonio es la de GDH. La ruta GS/GOGAT se utiliza en condiciones limitantes de amonio como cuando la bacteria fija nitrógeno (3).

Regulación de GS en enterobacterias:

La glutamino sintetasa en bacterias entéricas se encuentra regulada tanto a nivel de actividad como de síntesis en respuesta a la calidad y cantidad de la fuente de nitrógeno. Así, cuando las bacterias entéricas crecen en exceso de amonio, la GS tiende a adenilarse reduciendo su actividad biosintética. En cultivos en los que la fuente de nitrógeno es limitada, la GS se desadenila aumentando su actividad. En estas últimas condiciones, la proporción glutamina/2-oxoglutarato en las células es baja por lo que se induce la síntesis de GS (4).

La regulación de la síntesis de GS a nivel genético está dada por un sistema de genes conocido como ntr que es regulado a su vez por la fuente de nitrógeno en el medio (5). Este sistema ntr regula también genes para la degradación de los aminoácidos histidina (hut), arginina (aut), prolina (put) y algunas permeasas. En Klebsiella pneumoniae los genes que codifican para la nitrogenasa (complejo enzimático que reduce el nitrógeno atmosférico a amonio) son también regulados por el sistema ntr (6).

Asimilación de amonio en especies de Rhizobium en vida libre:

Se ha propuesto que en especies de Rhizobium la vía utilizada para la asimilación de amonio en vida libre es GS/GOGAT, ya que mutantes auxótrofos de glutamato de R. leguminosarum, R. japonicum, R. cowpea, R. trifolii, R. meliloti y R. sesbania, no asimilan amonio. En estas mutantes la actividad de GOGAT es deficiente y la GDH no está alterada (7, 8 y 9). Además, en R. cowpea y R. meliloti ni siquiera se detecta actividad de GDH (10) y sí se encuentra actividad de GOGAT. Sin embargo, en R. leguminosarum, R. trifolii y R. japonicum la asimilación de amonio procede por la vía GDH en condiciones limitantes de glucosa y en exceso de nitrógeno inorgánico (11). En R. phaseoli no se detecta actividad de GDH por lo que se concluye que la asimilación de amonio en este organismo se realiza únicamente por la vía GS/GOGAT (12).

Glutamino sintetasa en Rhizobium:

Las especies de Rhizobium poseen dos tipos de enzimas glutamino sintetasa. La GSI es similar a la encontrada en enterobacterias pues es una enzima termoestable, compuesta de doce subunidades idénticas con un peso molecular de 59 000 daltons cada una. Su actividad se regula mediante el sistema adenilación-desadenilación de las subunidades de la enzima. La GSII sólo se presenta en los genes de Rhizobium y Agrobacterium (bacterias que interaccionan con plantas), tiene menos subunidades y es termolábil (13). En R. phaseoli creciendo en vida libre se ha visto que estas dos enzimas se regulan de manera coordinada y complementaria en diferentes - fuentes de nitrógeno. Por coordinada se entiende que la actividad de GSI se induce en condiciones de exceso de amonio como en NH_4Cl y glutamina, mientras que la GSII se induce en fuentes limitantes de

amonio como en arginina y KNO_3 . La regulación de la GSI y GSII es complementaria pues al aumentar la actividad de una GS, disminuye la de la otra. De esta manera la GSI se induce cuando las bacterias crecen en condiciones de limitación de amonio, mientras que no se registra GSII en estas condiciones. Los niveles de GSI por el contrario disminuyen en medio mínimo con una sola fuente de nitrógeno donde la GSII está inducida (12). La regulación a nivel genético de la GSI y GSII de R. phaseoli ha sido poco estudiada.

Glutamino sintetasa durante la simbiosis:

Las glutamino sintetetasas I y II en especies de Rhizobium creciendo en vida libre son funcionales dependiendo de las condiciones del medio. En cambio, durante la simbiosis con raíces de plantas leguminosas se ha visto que en los bacteroides estas dos enzimas se inactivan y/o desaparecen.

En un estudio de Robertson et al (1975) (14), se midió la actividad de glutamino sintetasa durante el desarrollo nodular inducido por R. lupini en su huésped. La actividad de esta enzima en la fracción proteica vegetal del nódulo aumenta entre 10 y 20 días después de inocular las raíces de Lupinus luteus con bacterias. Por el contrario, la actividad de GS detectada en los bacteroides se mantuvo muy baja durante todas las mediciones. Varios grupos de investigación han observado que más del 90% del total de glutamino sintetasa encontrada en los nódulos de especies de Rhizobium, se detecta en la fracción vegetal y no en los bacteroides (11, 15, 16, 17). Por otro lado, los niveles de GS encontrados en bacterias de R. japonicum fijando nitrógeno en vida libre

corresponden a GSI adenilada, mientras que la GSII desaparece (18).

Estas evidencias sugieren fuertemente que el nitrógeno fijado en los bacteroides se excreta al citosol de células vegetales y es asimilado por una glutamino sintetasa de la planta. La inactivación de la GSI y desaparición de la GSII en los bacteroides aseguraría que el nitrógeno fijado no fuera asimilado por los bacteroides.

Regulación a nivel genético de la asimilación de amonio y la fijación de nitrógeno en enterobacterias:

El sistema genético que regula la síntesis de GS en la enterobacteria de vida libre Klebsiella pneumoniae se ha estudiado detalladamente. En este organismo, el gen estructural de la enzima glutamino sintetasa (glnA), se encuentra formando un operón con los genes reguladores ntrB y ntrC. Los productos de los genes ntrB y ntrC junto con el producto de ntrA regulan la síntesis de enzimas necesarias para la asimilación de gran variedad de compuestos nitrogenados entre los que se incluye la GS y los genes responsables de la fijación de nitrógeno (genes nif) (19-22). Es decir, los genes reguladores de glnA también participan en la regulación transcripcional de los genes nif.

Los genes nif de K. pneumoniae se encuentran agrupados en ocho unidades transcripcionales u operones (23, 24 y 25) que incluyen al operón nifHDK que contiene los genes estructurales de la nitrogenasa y al operón nifLA, que contiene a los genes reguladores, - siendo el producto de nifA un activador (26, 27), y el producto de nifL un represor (28, 29, 30).

La expresión de los genes nif en este organismo está regulada

en dos niveles: el primer nivel lo ejerce el sistema regulatorio general del metabolismo nitrogenado (ntr) que está compuesto por los genes ntrA, ntrB y ntrC antes mencionados. Los productos de los genes ntrA y ntrC, en condiciones limitantes de amonio, interactúan para activar la transcripción del operón nifLA (31, 22, 32,33) cuyos productos son responsables del segundo nivel de regulación, ya que el producto de nifA es necesario junto con ntrA para activar la transcripción de todos los demás operones nif. El producto de nifL controla la represión por amonio de los operones nif (Fig. 1).

Regulación a nivel genético de la asimilación de amonio y fijación de nitrógeno en Rhizobium:

En especies de Rhizobium los genes que codifican para los polipéptidos de la nitrogenasa nifH, nifD y nifK han sido clonados y caracterizados (34-39). Se encontró que en R. meliloti y en R. leguminosarum (34, 35 y 36) estos genes están organizados en un solo operón nifHDK como en K. pneumoniae.

En cuanto a la regulación de la fijación simbiótica de nitrógeno en R. meliloti y R. leguminosarum se ha demostrado la presencia de un gen regulador análogo al gen nifA descrito para K. pneumoniae. El producto de este gen similar a nifA se requiere para la activación del operón nifHDK (40); además, este gen hibridiza con los genes regulatorios nifA de K. pneumoniae y con ntrC de E. coli (41).

Estos estudios sugieren que en parte la regulación de la fijación de nitrógeno en Rhizobium se lleva a cabo mediante un mecanismo parecido al de K. pneumoniae. Otras evidencias de la exis-

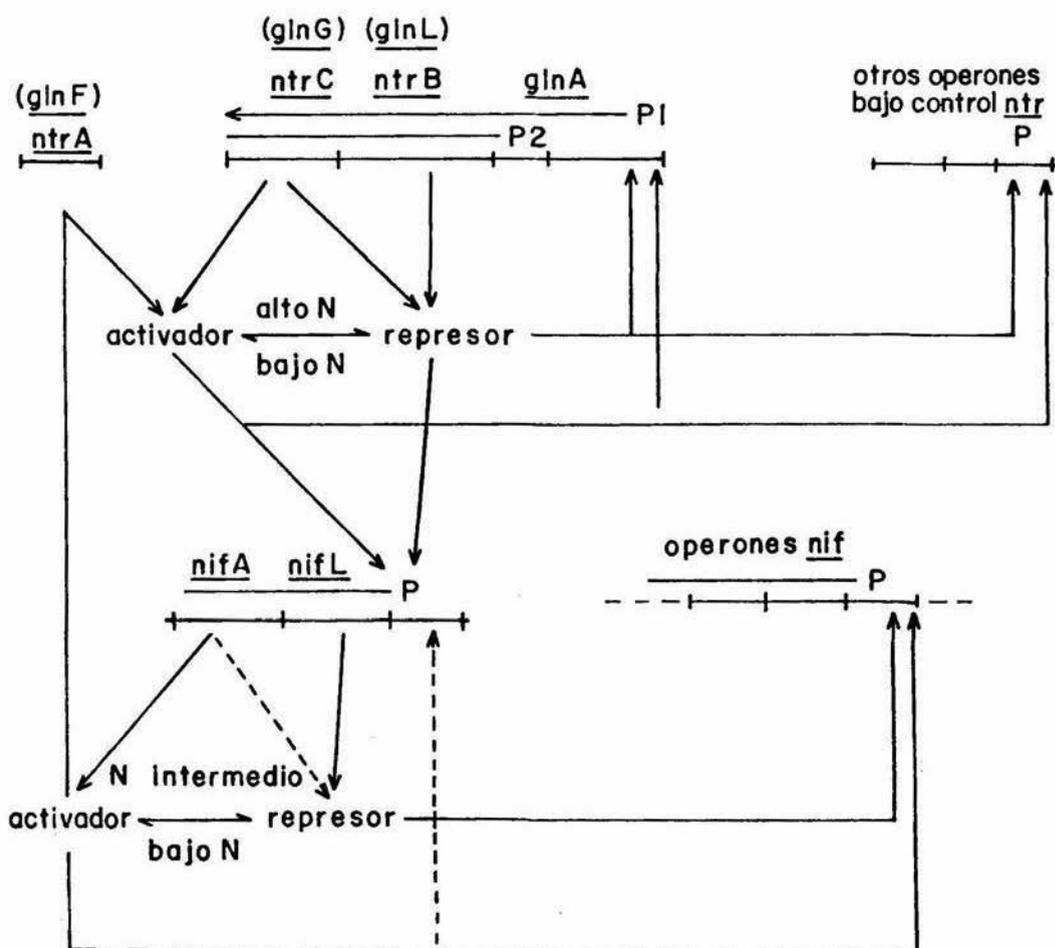


Fig. 1. Modelo para el control nitrogenado de la fijación de nitrógeno en *K. pneumoniae* (22).

tencia de este tipo de mecanismo regulador similar al sistema ntr de K. pneumoniae, son las mutaciones que alteran la síntesis de glutamina en R. meliloti (42), R. phaseoli (43) y Rhizobium spp. (44) y que producen un fenotipo Fix^- (incapaz de fijar nitrógeno). En Rhizobium spp. estas mutantes pierden la actividad de GSII y la GSI se encuentra inactivada. Cuando estas mutantes recuperan la actividad de GSI, se recupera también la actividad nitrogenasa. Sin embargo, revertantes de la actividad GSII, no fijan nitrógeno (45). Las mutantes Gln^- de R. meliloti forman nódulos pequeños de color blanco que no fijan nitrógeno y las revertantes Gln^+ recuperan la actividad de nitrogenasa (46). Sin embargo, estas mutantes no fueron analizadas genéticamente por lo que se desconoce si sus fenotipos son el producto de una ó de varias mutaciones.

Aunque lo anterior sugiere la presencia de un sistema ntr en Rhizobium estudios recientes en R. meliloti indican que estos genes reguladores no se encuentran formando un operón con el gen estructural de la GSI ya que mutaciones polares (por inserción de un fragmento de 2.7 Kb que lleva la resistencia a tetraciclina derivada del Tn10) en glnA, no tienen efecto sobre nodulación ni fijación de nitrógeno (47). La GSI aparentemente no participa en la regulación de la fijación de nitrógeno en R. meliloti. Sin embargo, todos estos datos aún no descartan un posible papel de los sistemas regulatorios de GSI y/o GSII en la regulación de los genes nif en Rhizobium.

En nuestro grupo de trabajo se estudia la regulación de la fijación de nitrógeno en R. phaseoli y, específicamente el papel de los sistemas regulatorios de las glutamino sintetasas.

Siguiendo la estrategia de mutagénesis al azar de R. phaseoli

que resulte en alteraciones en la síntesis ó regulación de las glutamino sintetetasas, se aislaron en este laboratorio algunas clonas de mutantes con alteraciones en la síntesis de glutamina y/o fijación de nitrógeno. Estas mutantes se aislaron por su sensibilidad aumentada a metionina sulfoximina (MS) que es un inhibidor específico de la actividad de glutamino sintetasa. Se obtuvieron dos tipos principales de mutantes (MS^S):

- mutantes con niveles bajos de GSI y GSII incapaces de fijar nitrógeno
- mutantes sin actividad de transferasa de GSII capaces de fijar nitrógeno (43).

Estos resultados sugieren que en R. phaseoli existe un gen ó genes involucrados tanto en la asimilación de amonio como en la fijación de nitrógeno y que mutaciones que alteran la actividad GSII no alteran la fijación de nitrógeno. Sin embargo, no se ha demostrado si estas mutaciones mapean en el gen estructural para GSII.

OBJETIVO:

Los datos hasta aquí presentados sugieren la presencia de genes reguladores comunes para la asimilación de amonio y fijación de nitrógeno en R. phaseoli.

El estudio de la regulación de las glutamino sintetasas en R. phaseoli a nivel molecular requiere de mutantes en los genes estructurales de las dos GS. El análisis de los fenotipos Fix y Gln de estas mutantes durante el desarrollo nodular y la fijación de nitrógeno nos dará información sobre la regulación de las glutamino sintetasas y de su relación con la fijación de nitrógeno.

El objetivo de este trabajo es la identificación, clonación y mutagénesis del gen estructural de la glutamino sintetasa II de R. phaseoli para posteriormente substituir el gen silvestre por el gen mutado, mediante doble recombinación, en el genoma de la cepa silvestre y así, obtener mutantes GSII⁻.

MATERIAL Y METODOS

Cepas y plásmidos:

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados y construídos en este trabajo se enlistan en las tablas 1 y 2.

Medios y condiciones de cultivo:

R. phaseoli se cultivó en PY preparado como se describe en Noel et al (1984). Las cepas de E. coli se cultivaron a 37 C en LB (peptona de caseína 1.0%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1.0%). Para el crecimiento de K. pneumoniae se utilizó MM preparado como se describe en Dixon et al (1977) suplementado en caso necesario con glutamina (Gln) 200 ug/ml e histidina (His) 5 ug/ml esterilizados por filtración. Se agregó 1.5% de agar a los medios de cultivo mencionados para solidificarlos. La selección de colonias de la cepa JM83 de E. coli que llevan el plásmido pRK404 con inserto se hizo en medio Mac Conkey. Los antibióticos se aplicaron en las siguientes concentraciones: tetraciclina (Tc) 10 ug/ml, cloranfenicol (Cm) 50 ug/ml, ampicilina (Ap) 50 ug/ml, kanamicina (Km) 30 ug/ml, neomicina (Neo) 25 ug/ml.

Conjugaciones y transformaciones bacterianas:

Las conjugaciones se hicieron sobre LB sólido procurando que la proporción de células donadoras, receptoras y "ayudadoras" fuera la misma. Después de incubar las células a 37 C toda la

Tabla 1. Bacterias utilizadas en este trabajo

Cepa	Características	Referencia
<u>Rhizobium phaseoli</u>		
CPN42	Silvestre (aislamiento de campo)	Quinto <u>et al</u> (1982)
<u>Escherichia coli</u>		
JM83	λ ara Δ (pro-lac) rpsL thi Ø80 dlac Z Δ M15 λ ⁻ . Huésped lacZ ⁻ para plásmidos lacZ ⁺	Stein <u>et al</u> (1982)
MC1061	Δ (lacIPOZYA)x74, galU, galK, strA ^r hsdR ⁻ Δ (ara, leu)	Casadaban, M (1980)
HB101	<u>recA</u> <u>hsdR</u> <u>hsdM</u> <u>pro</u> <u>leu</u> <u>strA</u> <u>EndoI</u> <u>thi</u> <u>lacY</u>	Boyer <u>et al</u> (1969)
S605	Km ^r Rif ^r Ap ^r no crece en MM C600 met::Tn5	Simon, R (1984)
NK5561	F ⁻ lacZ 2900 :: Tn10	Kleckner, N
<u>Klebsiella pneumoniae</u>		
UNF1751	his ⁻ <u>glnA</u> 201 Ap ^r	Espín (no publicado)
UNF1811	<u>glnA</u> 202 Ap ^r	Espín (no publicado)

Tabla 2. Plásmidos utilizados y construídos en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pFB6162	Derivado de pACYC184 con <u>glnT</u> de <u>R. meliloti</u> clonado en BamHI	de Bruijn, et al (1984)
pRK404	Derivado de pRK252 con "polyliner" de pUC9 y lac Z	Ditta, G. (1985)
pmw2	Derivado de pRK404 clonado en BamHI con <u>glnT</u> de <u>R. phaseoli</u> Tc ^r	este trabajo
pSUP205	Derivado de pBR325 con MOB de RP4 y cos de λ Cm ^r Tc ^r Ap ^s	Simon <u>et al</u> (1983)
pmw4	derivado de pSUP205 con <u>glnT</u> de <u>R. phaseoli</u> clonado en BamHI Cm ^r Tc ^s Ap ^s	este trabajo
pmw202	derivado de pSUP205 deletado en cos Cm ^r Ap ^r Tc ^r (análogo a pSUP202)	este trabajo
pmw5	derivado de pSUP202 con <u>glnT</u> de <u>R. phaseoli</u> clonado en BamHI Cm ^r Ap ^r Tc ^s	este trabajo
pmw7	inserción <u>in vivo</u> de Tn5 en <u>glnT</u> de pmw5 <u>glnT</u> ⁻ Km ^r Cm ^r Ap ^r Tc ^s	este trabajo
pRK2013	derivado de ColE1 con la región <u>tra</u> de RK2	Guiney <u>et al</u> (1979)
pJB3	derivado Km ^s de R68.45 <u>IncPY</u> Cm ^r Ap ^r	Brewin <u>et al</u> (1980)

noche se resuspendieron en 3 ml de NaCl 0.85% y se platearon en medio selectivo. Las transformaciones se hicieron de acuerdo a Maniatis et al (1982).

Purificación de ADN total y condiciones de digestión:

Para la purificación de ADN total de R. phaseoli se centrifugaron 1.5 ml de un precultivo en fase estacionaria. Las células se lisaron al agregar 100 ul de Sarkosyl al 5% en TE (Tris 50 mM, EDTA 20 mM pH8) y 100 ul de pronasa 2.5 mg/ml incubadas a 37 C por una hora. El lisado se pasó por una jeringa para reducir la viscosidad y se hicieron dos extracciones con fenol equilibrado en TE y cloroformo. Se precipitó el ADN con 0.25 M de NaCl concentración final y dos volúmenes de etanol. Después de congelar la solución a -70 C se centrifugó 5 min a 4 C, se secó por evaporación y se resuspendió en agua estéril. Las condiciones de digestión fueron las mismas que las reportadas por Quinto et al (1982).

Manipulación de ADN:

Las técnicas empleadas para el aislamiento de plásmido (lisis alcalina), purificación de bacteriófagos, purificación de fragmentos de ADN (condiciones de digestión y gel preparativo) así como las condiciones de clonación están ampliamente descritas en Maniatis et al (1982).

Condiciones de hibridización:

El plásmido utilizado como detector (pFB6162) se marcó con ^{32}P mediante "nick-translation" (Rigby et al 1977). El ADN de R. phaseoli se hibridizó contra el pFB6162 radiactivo por el método de Southern descrito en Maniatis et al (1982) bajo condiciones de baja estringencia iónica a 65 C para detectores homólogos. La hibridización de las placas de fagos se hizo como se describe en Benton et al (1977).

Determinación de las actividades enzimáticas de glutamino sintetasa:

Las actividades de las GS se determinaron por método "transferasa" y "sintetasa" (Bender et al 1977). Se colectaron por centrifugación 50 ml de un cultivo en MM glu; la pastilla se lavó dos veces con solución de extracción (imidazol 10 mM, MnCl_2 1.0 mM, pH 7.0) y se determinaron las actividades de GS en células totales permeabilizadas a 30 C y 50 C.

Determinación de proteína:

Para calcular las actividades específicas de las GS se determinaron las concentraciones de proteína de acuerdo al método de Lowry et al (1951).

Selección de cepas resistentes a altas concentraciones de Neomicina y Kanamicina:

La selección de estas cepas se llevó a cabo en placas de LB Km₃₀ y LB Neo₂₅ a las que se adicionó una gota de Km₁₅₀ y Neo₃₀₀ respectivamente. Se dejó difundir el antibiótico durante 4 hrs.

antes de platear un precultivo en fase estacionaria de la cepa
S605 :: Tn5 pMW4 para seleccionar inserciones de Tn5 en el pMW4.

RESULTADOS

Identificación de la secuencia homóloga a pFB6162:

El plásmido pFB6162 construido por F.J. de Bruijn (1984), - lleva clonada una secuencia de ADN que codifica para la enzima - glutamino sintetasa II (glnT) de R. meliloti. Esta secuencia - se encuentra en un fragmento de restricción BamHI de 10 kilobases (Kb) clonado en el plásmido pACYC184. El pFB6162 complementa la auxotrofia por glutamina en una cepa de E. coli deletada en el operón glnA-ntrBC.

Para identificar a un gen que codifique para actividad de glutamino sintetasa en R. phaseoli CFN42, se hibridizó el ADN total de esta cepa digerido con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI contra pFB6162 marcado radiactivamente en un experimento de transferencia en Southern (fig. 2). Se encontraron tres fragmentos de restricción BamHI de 12, 5.7 y 3.5 Kb y cinco fragmentos RcoRI - de 3.3, 2.8, 2.3, 1.7 y 1.0 Kb de la CFN42 con homología a - pFB6162. En este laboratorio se ha hibridizado ADN de la CFN42 contra pACYC184 y no se encontró homología (S. Moreno, no publicado) por lo que las bandas de hibridización de la figura 2 se - deben a homología entre ADN de R. meliloti y R. phaseoli.

Clonación del fragmento de restricción BamHI homólogo:

Una vez identificados los fragmentos de ADN de la cepa CFN42 que contienen homología con el plásmido pFB6162, se procedió a aislar y clonar estos fragmentos. Para aislarlos se hibridizó el plásmido pFB6162 contra un banco de genes de la cepa CFN42.

Este banco se construyó clonando digestiones parciales de BamHI del ADN total de la cepa CFN42 en el colifago lambda 1059 (donado por E. Calva y col.).

Para localizar los fagos del banco con homología a pFB6162 se hicieron impresiones en filtros de nitrocelulosa, de las placas de lisis formadas por los fagos en un césped celular. Los filtros se hibridizaron contra pFB6162 marcado radiactivamente. El resultado de este experimento fue la identificación de dos fagos (5 y 45) que contenían secuencias homólogas al pFB6162. Estos fagos resultaron idénticos en el patrón de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI y se encontró que contenían los fragmentos EcoRI de 3.3 y 1.7 Kb, y los fragmentos BamHI de 12 y 3.5 Kb previamente identificados (fig. 2). Se decidió trabajar con los fragmentos BamHI del fago 5 ya que el banco de la CFN42 de donde proviene, está clonado en BamHI y dos de los fragmentos EcoRI del fago 5 deben contener también secuencias del fago lambda 1059 utilizado como vector. Utilizando sólo los fragmentos BamHI se tiene la seguridad de que las secuencias de ADN con las que se trabaje sean exclusivamente de R. phaseoli. Los fragmentos BamHI del fago 5 se reclonaron in vitro en el sitio BamHI del plásmido pRK404. Este plásmido resistente a tetraciclina es capaz de ser movilizado y de replicarse en R. phaseoli. Además lleva una secuencia "polylinker" (sitio múltiple para clonación) después del promotor del operón para la utilización de lactosa (lac). Así, cuando el pRK404 lleva alguna secuencia clonada en el "polylinker", quedan interrumpidos los genes para la uti-

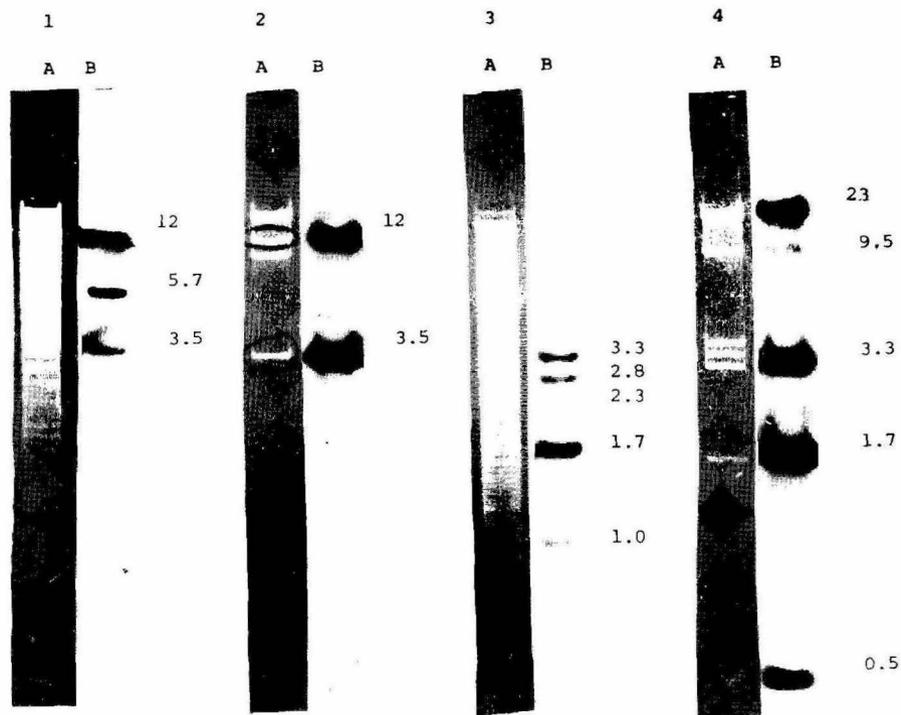


Fig. 2 Hibridización vs ^{32}P pFB6162 del ADN total de la cepa CFN42 digerido con BamHI (1) y EcoRI(3) y del fago 5 digerido con BamHI (2) y EcoRI (4). El ADN seseparó por electroforesis (carriles A), se transfirió a filtros de nitrocelulosa e hibridizó vs ^{32}P pFB6162 (carriles B).

lización de este carbohidrato.

Los plásmidos clonados se transformaron a la cepa de E. coli JM83. Esta cepa lleva una delección lac que no le permite metabolizar lactosa a menos que haya complementación en trans con el pRK404 sin inserto. La identificación de transformantes incapaces de metabolizar lactosa (Lac^-) en medio Mac Conkey con tetraciclina permitió aislar una clona que llevaba el fragmento BamHI de 3.5 Kb del fago 5. Este plásmido pMW1 se movilizó a la cepa UNF1751 de K. pneumoniae auxótrofa de glutamina e histidina (Gln^- , His^-) usando el plásmido pRK2013 como "movilizador" en la transferencia. La cepa UNF1751 pMW1 es incapaz de crecer en MM His, Tc, lo que podía indicar lo siguiente:

- que la secuencia de 3.5 Kb de R. phaseoli no llevara genes que codificaran para glutamino sintetasa.
- que esta secuencia sí codificara para glutamino sintetasa de R. phaseoli, pero que el gen no se transcribiera por tratarse de un gen interespecífico, ó bien, que sí hubiera transcripción de este gen pero que la GS sintetizada no tuviera actividad en cepas de K. pneumoniae.

Se decidió tomar 100 de las transformantes JM83 Lac^- , Tc^r y conyugarlas masivamente con la cepa UNF1751. Aquellas transconjugantes que fueran capaces de crecer en MM His, Tc, posiblemente llevarían el pRK404 con la secuencia deseada. Después de cinco días de incubación empezaron a crecer unas colonias pequeñas y blancas que contenían el plásmido pRK 404 con el fragmento BamHI de 12 Kb. A este plásmido capaz de complementar a la UNF1751 - se le llamó pMW2. Para checar si el fenotipo Gln^+ de esta cepa

estaba dado por el pMW2, se movilizó este plásmido a otra cepa auxótrofa de glutamina (UNF1811). La cepa UNF1811 pMW2 también es capaz de crecer en ausencia de glutamina. Este resultado indica que la secuencia de 12 Kb de R. phaseoli clonada codifica para alguna enzima que permite el crecimiento de cepas de K. pneumoniae Gln⁻.

Análisis de restricción del pMW2:

Como se alcanza a apreciar en la figura 3, el pMW2 digerido con la enzima de restricción BamHI resulta en dos fragmentos - correspondientes al pRK404 de 10.6 Kb y a la secuencia clonada de 12 Kb de R. phaseoli. El patrón de restricción del fragmento de 12 Kb digerido con EcoRI tiene tres bandas de 3.9, 3.5 y 3.1 Kb.

Actividad de glutamino sintetasa:

El fenotipo Gln⁻ de la cepa UNF1751 está dado por una mutación puntual en el gen glnA inducida con etil metano sulfonato y enriqueciendo con penicilina para auxótrofos de glutamina. - Se ha observado que esta mutante no revierte hasta frecuencias de 1×10^{10} (G. Espín, comunicación personal). La cepa UNF1811 deriva de la UNF1751 y lleva la misma mutación puntual en glnA y frecuencia de reversión para este gen que la UNF1751. Para que estas cepas puedan crecer en ausencia de glutamina es necesaria la presencia de genes que codifiquen para actividad de GS. El producto de los genes clonados en el pMW2 tiene, aparentemente,

Cepa	Sintetasa	Transferasa
UNF 1811	0.003	N.D.
UNF 1811 pMW2	0.110 (a 50 C 0.115)	0.008

Tabla 3 . Actividad específica de las enzimas GSI y GSII de la cepa UNF 1811 pMW2. Actividades de sintetasa y transferasa - medidas por el método de Bender et al, 1977.

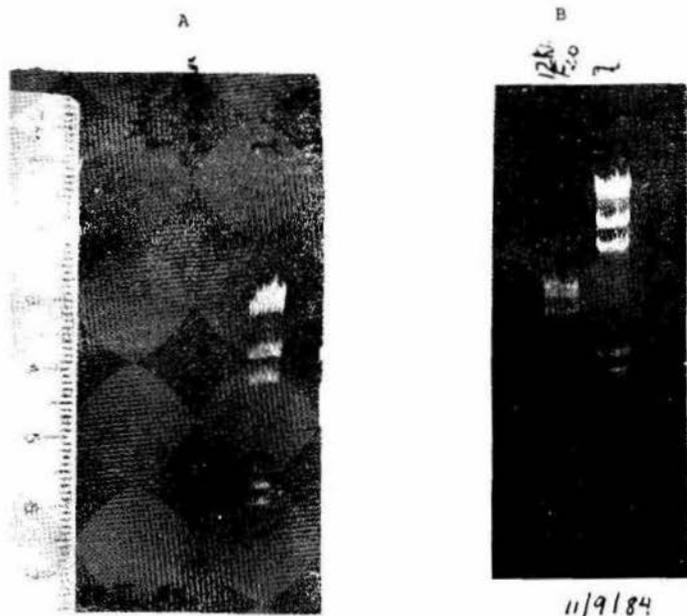


Fig. 3 A. Plásmido pMW2 (pRK404 + 12 Kb) digerido con la enzima de restricción BamHI. B. Fragmento BamHI de 12 Kb digerido con EcoRI.

actividad de GS de R. phaseoli . Esta actividad se manifiesta en las cepas de K. pneumoniae Gln⁻

Para caracterizar más detalladamente la clona pMW2 construída y verificar que las 12 Kb de R. phaseoli clonadas codifican realmente para glutamino sintetasa, se procedió a la medición de actividad de sintetasa y transferasa de la GS en la cepa - UNF1811 pMW2. Se determinó que la cepa UNF1811 pMW2 tiene actividad de sintetasa estable al calor (tabla 1); sin embargo, no se detectó actividad de transferasa.

Construcción del plásmido pMW4:

Para obtener mutantes de R. phaseoli GSII⁻ es necesaria una mutagénesis sitio dirigida y así substituir el gen glnT silvestre por el mutado. Por lo tanto es necesario mutagenizar la secuencia glnT clonada y que el vector que lleva clonado glnT no se replique en R. phaseoli para poder seleccionar el evento de doble recombinación.

Entre los plásmidos que no se replican en R. phaseoli está el pSUP205 derivado de pBR325, multicopia, que contiene el sitio -cos del fago lambda y la región Mob del plásmido RP4 que le permite ser movilizado. El pSUP205 lleva genes de resistencia a los antibióticos cloranfenicol y tetraciclina. Los genes de resistencia a tetraciclina tienen un sitio de restricción BamHI en donde se reclonó el inserto de 12 Kb del pMW2 (fig. 4). El plásmido resultante pMW4, complementa a la cepa UNF1811 (Gln⁻) después de 7 días de incubación en MM Cm. Esta complementación es pobre debido probablemente a la orientación invertida del inserto con respecto a la del pMW5 (ver adelante).

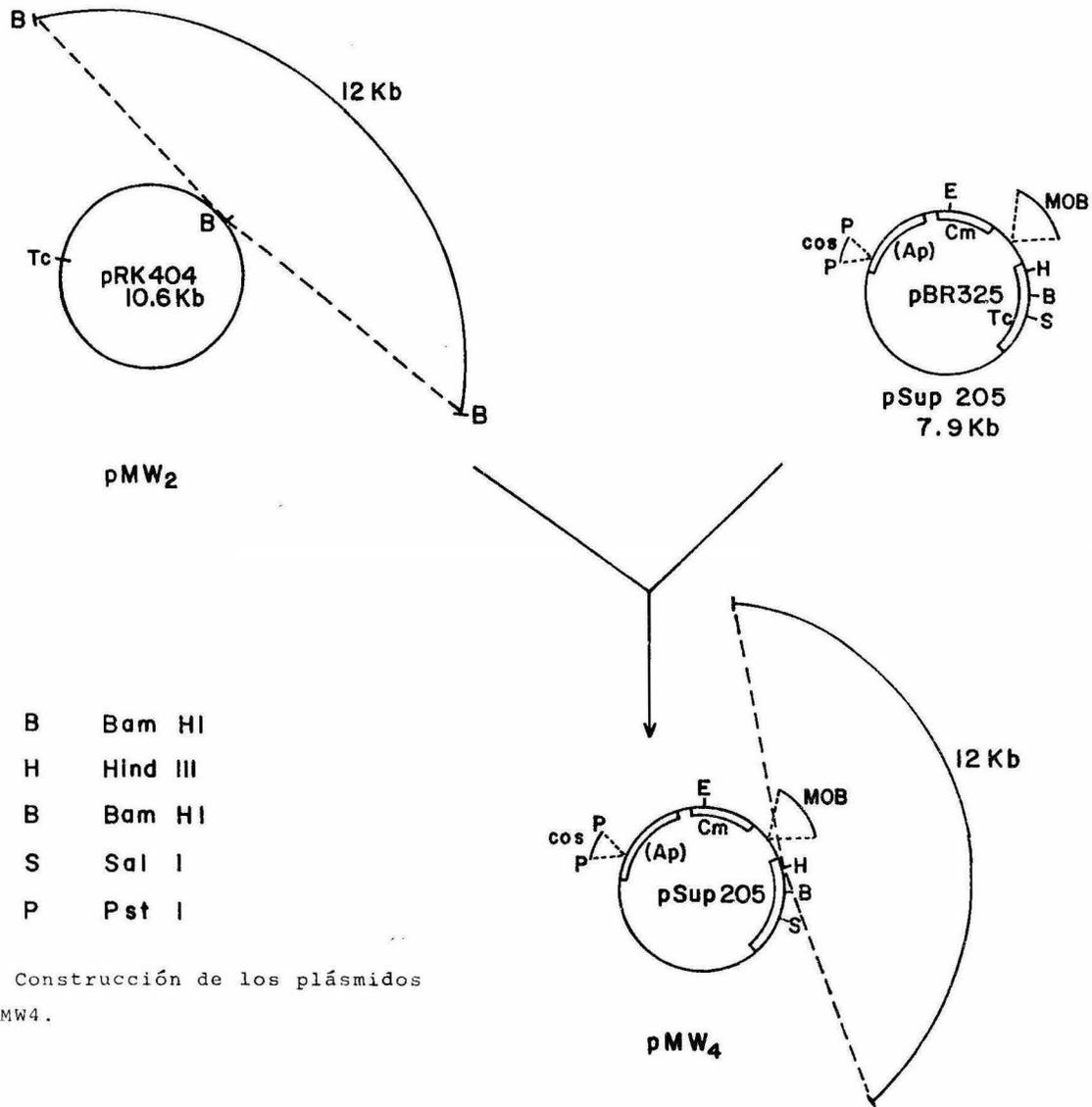


Fig. 4 Construcción de los plásmidos pMW₂ y pMW₄.

Mutagénesis del pMW4 con el transposón Tn5:

Para mutagenizar al plásmido pMW4 en el gen glnT que lleva clonado, se utilizó el transposón Tn5 debido a que confiere resistencia a kanamicina y neomicina en E. coli y R. phaseoli y a que la inserción de Tn5 ocurre casi siempre al azar provocando, por lo general, mutaciones polares por inserción (54).

Se transformó el pMW4 a una cepa de E. coli que lleva insertado el Tn5 en el cromosoma (S605 :: Tn5). Debido a que el pMW4 es un plásmido multicopia, inserciones de Tn5 en este plásmido aumentarían el grado de resistencia a kanamicina y neomicina.

Se observó que en Neo₅₀₀ (0.5 mg/ml) era posible distinguir claramente posibles mutantes que llevaban Tn5 en el pMW4. El análisis de restricción de los plásmidos contenidos en estas colonias S605 :: Tn5 pMW4 indicó que sí hubo inserciones de Tn5 en plásmido. Sin embargo, todas las inserciones analizadas contenían al transposón en el mismo sitio del vector (fig. 6).

Estos resultados indican que la inserción de Tn5 es localizada en este caso. Mediante análisis de restricción del pMW4::Tn5 se determinó que el sitio preferencial de inserción del Tn5 podría ser el sitio cos del fago lambda que lleva el pSUP205.

Construcción del pMW5:

Para poder mutagenizar la secuencia glnT clonada, se decidió seguir las siguientes estrategias:

1. Utilizar el transposón Tn10 que confiere resistencia a tetraciclina.

2. Utilizar un vector sin el sitio cos de lambda.

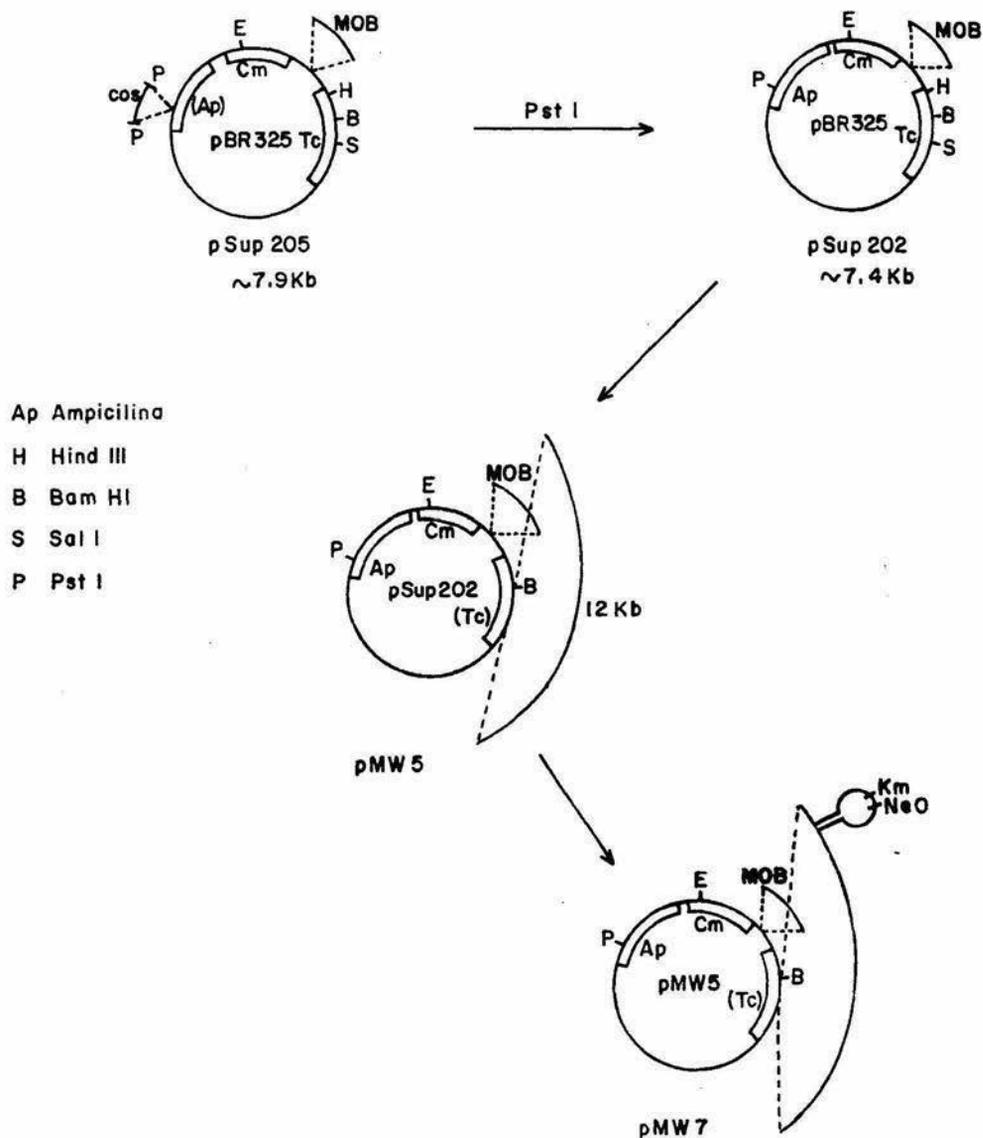
1. Mutaagénesis con Tn10:

Se movilizó el pMW4 (pSUP205 + 12 Kb) a una cepa de E. coli w3110 lac :: Tn10 que lleva insertado el Tn10 en cromosoma. La cepa resultante w3110 lac :: Tn10 pMW4 se usó como donadora en una cruce donde se seleccionó la cotransferencia del pMW4 (Cm^r) y Tn10 (Tc^r). Las colonias resistentes a cloranfenicol y tetraciclina aparecieron a una frecuencia muy baja y ninguna resultó ser inserciones de Tn10 en plásmido; posiblemente debido a la baja frecuencia de transposición de Tn10.

2. Construcción de un vector sin atrapador de Tn5:

El plásmido pSUP205 lleva clonada la secuencia cos de lambda en el sitio Pst I quedando interrumpido el gen que codifica para resistencia a ampicilina (fig. 6). La digestión de pSUP205 con la enzima Pst I seguida de una ligación con ligasa T4 permitió la eliminación del sitio cos regenerándose la resistencia a ampicilina. En este vector (pMW202) se reclonó el fragmento BamHI de 12 Kb purificado a partir del fago 5 del banco de la CPN42, resultando en el PMW5. Este plásmido complementa a K. pneumoniae Gln⁻ en dos días.

Fig. 5 Construcción de los plásmidos pMW5 y pMW7.

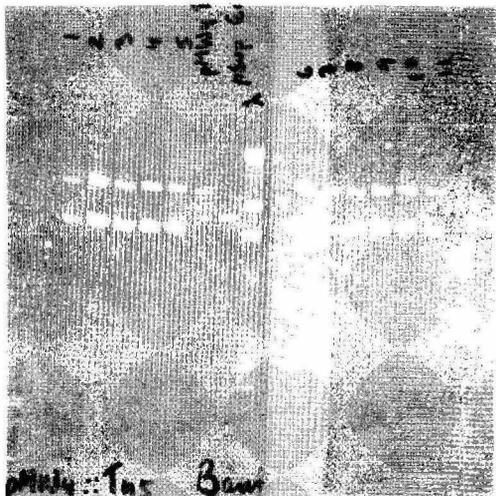


Mutagénesis del pMW5 con el transposón Tn5:

Una vez construido un plásmido sin sitio cos y que lleva clonado glnT de *R. phaseoli*, se procedió a mutagenizarlo. Se movilizó el pMW5 a la cepa S605 :: Tn5 usando el plásmido pJB3 como "movilizador" en la transferencia. Las transconjugantes analizadas llevaban también resistencia a tetraciclina que es el marcador del plásmido "movilizador".

La cepa resultante S605 :: Tn5 pMW5 pJB3 se conjugó con la UNF1811 para movilizar al pMW5 y seleccionar inserciones de Tn5 en glnT. Se seleccionaron transconjugantes incapaces de crecer en ausencia de glutamina y que llevaran pMW5. Se obtuvieron cinco colonias con inserciones de Tn5 en glnT del pMW5. Se observó que la secuencia responsable de la complementación (glnT) se encontraba en un extremo del inserto (fig. -). Inserciones de Tn5 de 0.8 a 1.1 Kb de distancia del sitio BamHI del inserto de 12 Kb resultan en la pérdida de la capacidad de complementar (fig. -).

A



B

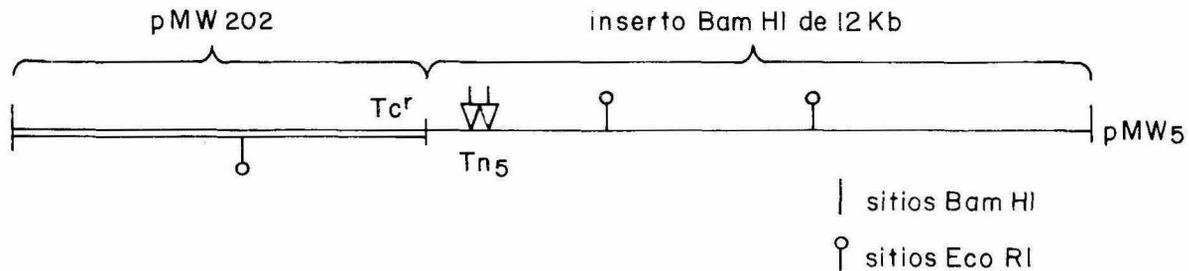
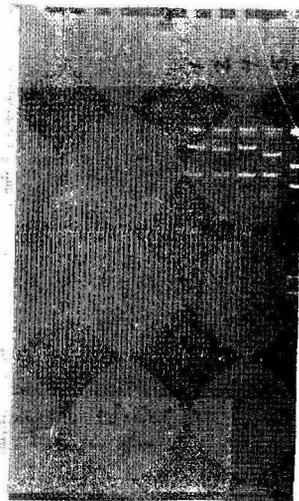


Fig. 6 A. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la inserción localizada del transposón Tn5 en el plásmido pMW4 digerido con BamHI. B. Inserciones al azar de Tn5 en el plásmido pMW5. ADN digerido con BamHI. La banda superior corresponde - al pJB3 linearizado. C. Modelo del plásmido pMW7 (pMW5 glnT :: Tn5).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La regulación de la glutamino sintetasa es de gran interés en Rhizobiaceae, ya que se piensa que la asimilación de amonio se encuentra inhibida en bacteroides. El nitrógeno recién fijado se exporta al citoplasma de las células vegetales en forma de amonio donde es asimilado por una glutamino sintetasa específica de nódulo codificada por el genoma de la planta. Para estudiar la regulación de la glutamino sintetasa a nivel molecular, se ha aislado el gen glnT (gen estructural para GSII) de R. phaseoli.

La obtención de mutantes de Rhizobiaceae en glutamino sintetasa se complica por el hecho de poseer por lo menos dos genes para GS. En este laboratorio, se ha tratado de aislar mutantes auxótrofos de glutamina de R. phaseoli a través de la mutagénesis con nitroso guanidina seguida de enriquecimientos con penicilina para cepas Gln⁻. Posiblemente debido a la necesidad de mutar dos genes para obtener este fenotipo y ya que la frecuencia con la que se obtendrían dichas auxótrofas es muy baja, no se logró aislar estas mutantes Gln⁻ de R. phaseoli.

Otra estrategia que se ha seguido para la obtención de estas mutantes ha sido la mutagénesis al azar de R. phaseoli con el transposón Tn5. Estas mutantes se aislaron por su sensibilidad aumentada a metionina sulfoximina (inhibidor específico de GS). Se obtuvieron así mutantes con niveles bajos de GSI

y GSII incapaces de fijar nitrógeno y mutantes sin actividad de transferasa de GSII capaces de fijar nitrógeno (43). Estos datos sugieren que en R. phaseoli existe un gen ó genes involucrados tanto en la asimilación de amonio como en la fijación de nitrógeno y que mutaciones que alteran la actividad GSII no alteran la fijación de nitrógeno. Sin embargo, no se ha demostrado si estas mutaciones mapean en el gen estructural para GSII.

Se decidió entonces seguir la estrategia de mutagénesis sitio dirigida que consiste en la substitución, mediante doble recombinación, de secuencias de ADN en cepas silvestres por secuencias homólogas mutagenizadas con el transposón Tn5. Para obtener mutantes glnT⁻ de R. phaseoli mediante mutagénesis sitio dirigida es necesario aislar, clonar y mutagenizar el gen glnT. En este trabajo, se siguieron los pasos enlistados a continuación:

1. Identificación en el genoma de R. phaseoli del gen que codifica para la GSII utilizando un plásmido que tiene clonado este gen de R. meliloti (49).
2. Aislamiento en un banco de genes de la cepa CFN42 construido en el fago lambda 1059 de la secuencia homóloga identificada.
3. Reclonación del fragmento de restricción homólogo.
4. Complementación con el plásmido que lleva clonado este fragmento de restricción homólogo, del fenotipo Gln⁻ en cepas de K. pneumoniae.
5. Mutagénesis de este plásmido con el transposón Tn5.

Los datos aquí presentados demuestran que los plásmidos que llevan clonado ADN de R. phaseoli homólogo a glnT de R. meliloti (pMW2, pMW4 y pMW5) son capaces de complementar cepas de K. pneumoniae auxótrofas de glutamina y permitir su crecimiento en medio mínimo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, el pMW4 tiene una capacidad pobre para esta complementación ya que se requieren 7 días para la aparición de las colonias de K. pneumoniae, mientras que la UNF1811 pMW5 crece en dos días. Una posible explicación para esta diferencia sería que el promotor a partir del cual se expresara el glnT clonado estuviera en el vector. La orientación del fragmento BamHI de 12 Kb clonado en el pMW4 no permitiría que el promotor del vector fuera funcional para glnT. En el pMW5 dicha orientación podría estar invertida con respecto a la del pMW4 permitiendo que el promotor del vector quedara en fase con glnT mejorándose así la complementación notablemente. Un análisis de los fragmentos de restricción producidos por alguna enzima daría información sobre la orientación del inserto clonado en el pMW4 y pMW5.

Al mutagenizar el pMW4 con Tn5 se encontraron resultados muy interesantes ya que la transposición de Tn5 en este caso es localizada. Se determinó que el sitio preferencial de inserción del Tn5 era el sitio cos del fago lambda que lleva el pSUP205 pues al eliminarlo la inserción es al azar. Este es el primer reporte de que el sitio cos del fago lambda sea un atrapador de Tn5.

Se determinó luego que el gen glnT se encuentra situado en un extremo del fragmento BamHI de 12 Kb clonado, ya que inserciones de Tn5 entre 0.8 y 1.1 Kb de distancia de uno de los sitios BamHI del inserto resultan en la pérdida de la capacidad de complemen-

tación para crecimiento de cepas de K. pneumoniae Gln^- . La cercanía de glnT al extremo del inserto apoyaría la hipótesis de que el promotor que se está utilizando para su expresión se encuentra en el vector.

La actividad de glutamino sintetasa que se detectó en estas cepas conteniendo pMW2 es estable al calor como la GS I. La termosensibilidad de la enzima glutamino sintetasa es una característica de la GS II, sin embargo, esta sensibilidad podría no expresarse en K. pneumoniae. Es decir, que la GS II clonada en este trabajo podría ser termoestable debido a que el gen glnT se estuviera expresando en un organismo distinto a Rhizobiaceas.

En cuanto a la falta de actividad de transferasa de glutamino sintetasa de la UNF1811 pMW2, no se ha podido determinar por qué existe actividad biosintética mientras que no se detecta actividad de transferasa. Sin embargo, este fenotipo GS II transferasa⁻ también se presenta en las mutantes de R. phaseoli antes descritas que fueron mutagenizadas al azar con Tn5 y seleccionadas por su sensibilidad aumentada a metionina sulfoximina. Esta similitud en fenotipos, si se explora detalladamente, podría sugerir que la GS clonada en el pMW2 sea la GS II. Sin embargo, una evidencia concluyente sería el análisis de la actividad de GS II en mutantes glnT :: Tn5 de R. phaseoli que se obtuvieran por doble recombinación con el pMW7 (que lleva glnT :: Tn5).

La estrategia de mutagénesis sitio dirigida para la obtención de mutantes glnT⁻ de R. phaseoli es aplicable también para mutantes glnA⁻ (gen estructural para la glutamino sintetasa I). En este laboratorio Soledad Moreno aisló el cósmido p240 de un banco de la cepa CPN42 de R. phaseoli construido en el vector pSUP205. Este cósmido complementa la auxotrofia por glutamina de cepas de K. pneumoniae y les confiere actividades de sintetasa y transferasa de glutamino sintetasa. El plásmido pSM240 lleva clonados dos fragmentos EcoRI derivados del cósmido p240. Estos dos fragmentos constituyen la secuencia mínima indispensable para que haya complementación con cepas de K. pneumoniae Gln⁻.

Los plásmidos pMW2 y pSM240 no tienen secuencias homólogas entre sí por lo que es posible que en estos dos plásmidos estén clonados los genes que codifican para las dos GS de R. phaseoli: glnT en el pMW2 y glnA en el pSM240.

La obtención de mutantes glnT⁻ y/o glnA⁻ de R. phaseoli y el estudio de su fenotipo simbiótico proporcionará valiosa información sobre el papel de estas enzimas y/o de sus sistemas regulatorios en la fijación de nitrógeno.

REFERENCIAS:

1. Verma, D.P.S., Long, S. (1983). The molecular biology of Rhizobium-legume symbiosis. En: International review of cytology. Suppl. 14. Jean, K. (ed.). Academic press N.Y. 211-245.
2. Tempest, D.W., Meers, J.L., Brown, C.M.: Glutamate Synthetase (GOGAT): a key enzyme in the assimilation of ammonia by prokaryotic organisms. In: The enzymes of glutamine metabolism, pp.167-182, ed. by Prusiner, S., Stadtman, E.R. New York: Academic Press 1973.
3. Nagatani, H., Shimizu, M., Valentine, R.C.: The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. Arch. fur Mikrobiol. 79, 164-175 (1971).
4. Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of Nitrogen compounds. Ann. Rev. Biochem. 47: 1127-62.
5. Magasanik, B. (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Ann. Rev. Genet. 16: 135-168.
6. Gottesman, S. (1984). Global regulation. Ann. Rev. Genet. 18: 430-433.
7. F.O'Gara, K.T. Shanmugam. Control of symbiotic nitrogen fixation in Rhizobia, regulation of NH_4^+ assimilation. Biochem. Biophys. Acta. 451: 342-352, 1976.
8. F. Sánchez, E. Calva, M. Campomanes, L. Guzmán, J.L. Saborío, R. Palacios. Heterogeneity of glutamine synthetase polipeptides in Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 255: 2231-2234, 1980.
9. H. Ali, C. Niel, J.B. Guillaume. The pathways of ammonia assimilation in Rhizobium meliloti. Arch. Microbiol. 129: 391-4, 1981.
10. R.A. Ludwig. Control of ammonium assimilation in Rhizobium 32H1. J. Bact. 135: 114-123, 1978.

11. C.M. Brown, M.J. Dilworth. Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol. 86: 39-48, 1975.
12. A. Bravo. Tesis de licenciatura en Investigación biomédica básica. UACP y P, CCH, UNAM. 1985.
13. Darrow, R.A. (1980). Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. En: Glutamine: metabolism, enzymology and regulation. Mora, J. and Palacios, R. (eds.) Academic Press New York. p139-165.
14. Robertson, J.G., Warburton, M.P., and Farnden, K.J.F. (1975) FEBS letts. 55, 33-37.
15. Dunn, S.D., Klucas, R.V. (1973) Can. J. Microbiol. 19, 1493-1499.
16. McParland, R.H., Guevara, J.G., Becker, R.R., Evans, H.J. (1976) Biochem. J. 153, 597-606.
17. Cullimore, J., Lara, M., Lea, P., Mifflin, B. (1983) Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of Phaseolus root nodules. Planta 157: 245-253.
18. Rao, V.R., Darrow, R.A., Keister, D.L. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 224-231.
19. Espín, G., Alvarez Morales A., Cannon F., Dixon R., Merrick M. (1982) Mol Gen Genet 186: 514-524.
20. de Bruijn F., Ausubel F. (1983) Mol Gen Genet 192: 342-353.
21. Ow D., Ausubel F. (1983) Nature 301: 307-313
22. Merrick M. (1983) EMBO J 2: 39-44.
23. Kennedy C., Cannon F., Cannon M., Dixon R., Hill S., Jenness J., Kumar S., Mac Clean P., Merrick M., Robson R., Postgate J. (1981) en Gibson AH, Newton WE, (eds) Current perspectives in nitrogen fixation. Australian Academy of Sciences. Canberra 146-156.

24. Roberts GP., Brill WJ. (1981) Ann Rev Microbiol 35: 207-235.
25. Beynon J., Cannon M., Buchanan-Wollaston V., Cannon F., (1983) Cell 34: 665-675.
26. Dixon R., Eady RR., Espín G., Hill S., Iaccarino M., Kahn D., Merrick M. (1980) Nature 286: 128-132.
27. Buchanan-Wollaston V., Cannon M., Beynon J., Cannon F., (1981) Nature 294: 776-778.
28. Buchanan-Wollaston V., Cannon M., Beynon., Cannon F., (1981) Mol Gen Genet 184: 102-106.
29. Hill, S., Kennedy, C., Kavanagh E., Goldberg R., Hanau R. (1981) Nature 290: 424-426.
30. Merrick M., Hill S., Hennecke H., Hahn H., Dixon R., Kennedy C., (1982) Mol Gen Genet. 185: 75-81.
31. Ow D., Ausubel F. (1983) Nature 301: 307-313.
32. Drummond M., Clements J., Merrick M., Dixon R., (1983) Nature 301: 302-307.
33. Dixon R., Alvarez Morales A., Clements J., Drummond M., Merrick M., Postgate J. (1984) en Veeger C., Newton WE. (eds) Advances in nitrogen fixation research. Nijhoff/Junk Pudoc Wageningen 635-642.
34. Ruvkun G., Ausubel F., (1981) Nature 289: 85.
35. Corbin D., Ditta G., Helinski D. (1982) J Bacteriol 149: 221
36. Ma Q., Johnston A., Hombrecker G., Downie A. (1982) Mol Gen Genet 187: 166-171.

37. Scott K., Huges J., Greshoff P., Beringer J., Rolfe B., Shine J. (1982) *J Mol Appl Genet* 1: 315-326.
38. Kaluza K., Fuhrmann M., Hahn M., Regensburger B., Hennecke H. (1983) *J Bacteriol* 155: 915-918.
39. Quinto C., de la Vega H., Flores M., Fernández L., Ballada T., Soberón G., Palacios R. (1982) *Nature* 299: 724-726.
40. Sundaresan, V., Jones, J.D.G., Ow, D.W., Ausubel, F. (1983). Klebsiella pneumoniae nifA product activates the Rhizobium meliloti nitrogenase promoter. *Nature* (London). 301: 728-732.
41. Szeto, W.W., Zimmerman, J.L., Sundaresan, V., Ausubel, F.M. (1984). A Rhizobium meliloti symbiotic regulation gene. *Cell* 36: 1035-1043.
42. Kondorosi, A., Svab, Z., Kiss, G.B., Dixon, R.A. (1977). Ammonia assimilation and nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. *Mol. Gen. Genet.* 151: 221-226.
43. Morett, E., Moreno, S., Espín, G. 1985. Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximine sensitive (MS^S) mutants of R. phaseoli. *Mol Gen Genet* 200: 229-234.
44. Ludwig, R.A., Singer, E.R. (1977). Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in Rhizobium. *Nature* (London) 267: 245-248.
45. Ludwig, R. (1980). Regulation of Rhizobium nitrogen fixation by the unadenylated glutamine synthetase I system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5817-5821.
46. Kondorosi, A., Svab, Z., Kiss, G.B., Dixon, R.A. (1977). Ammonia assimilation and nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. *Mol Gen Genet.* 151: 221-226.

47. Somerville, J.E., M.L. Kahn. 1983. Cloning of the glutamine synthetase I gene from Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 156: 168-176.
48. Ruvkun, G., Ausubel, F. (1981). A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. Nature. 289: 85-88.
49. de Bruijn, 1984. En: Advances in Nitrogen Fixation Research. Eds. C. Veeger y W.E. Newton. Nijhoff/junk. Pudoc Wageningen. 627-33.
50. Leemans, J., Deblaere, R., Willinitzer, L., De Greve, H. Hermalsteens, J.P., Van Montagu, M., Schell, J (1982). Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. EMBO J. 1: 147-152.
51. Benton, W.D. and Davis, R.W. (1977) Science 196, 180-182.
52. Simon R, Priefer U, Puhler A (1983a) Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulation of Gram-negative bacteria. In: Puhler A (ed) Molecular genetics of the bacterioplant interaction. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
53. Simon, R (1984) High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. Mol Gen Genet 196: 413-420.
54. Jorgenson, R.A., Rothstein, S.J., Reznikoff, W.S. Molec. gen. Genet. 177, 65-72 (1979).
55. Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., Cevallos, M.A. (1984). Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158: 148-155.
56. Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). En Molecular Cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Esta tesis se realizó gracias a:

- Guadalupe Espín, que la dirigió
- Soledad Moreno, que me enseñó a clonar, conjuguar, transformar, hibridizar, purificar ADN, etc. etc.
- Enrique Morett, por sus valiosas aportaciones de Biomédico
- las facilidades otorgadas por el CIPN
- una beca de CONACYT
- Flor y Jesús, que me quieren
- mi esfuerzo.