

03062 2
25

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE
CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Regulación genética de la asimilación de
amonio en *Rhizobium leguminosarum* biovar
phaseoli

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tesis que para obtener el grado de Doctor en
Investigación Biomédica Básica presenta:

Elda Guadalupe Espín Ocampo

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

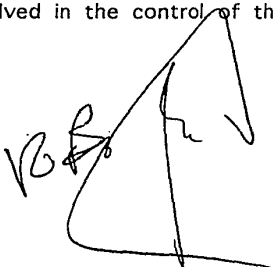
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

ABSTRACT

Genetic regulation of ammonia assimilation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*


Bacteria of the genus *Rhizobium* have a symbiotic interaction with leguminous plants. This results in the formation of specialized structures, the nodules, in which the bacteria differentiate into bacteroids and fix nitrogen. These bacteria assimilate ammonia for growth in the free-living state through the activities of two glutamine synthetases known as GSI and GSII, however in the nodules the ammonia produced by the nitrogenase is exported to the plant cell. In order to study the genetic regulation of ammonia assimilation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, in both the free-living and the symbiotic state we have identified, isolated and characterized, the structural genes *glnA* and *glnII* coding for GSI, GSII, and *glnT* a previously unrecognised gene coding for a third glutamine synthetase isozyme GSIII. This was accomplished either by complementation of *Klebsiella pneumoniae* glutamine auxotrophs with a gene library of the *R. l. phaseoli* genome or by hybridization of the *R. l. phaseoli* total DNA with heterologous *gln* genes as probes. By Tn5 random mutagenesis we have also identified two regulatory genes *ntrB* and *ntrC* homologous to those described in enteric bacteria. we have shown that these genes are involved in the control of the GSII synthesis and GSI activity.



RESUMEN

Regulación genética de la asimilación de amonio en *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.

Las bacterias del género *Rhizobium* forman asociaciones simbióticas con plantas leguminosas. El resultado de esta asociación es la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos, dentro de los cuales las bacterias se diferencian en bacteroides y fijan nitrógeno. Estas bacterias asimilan amonio del medio para crecer cuando se encuentran en vida libre a través de las actividades de dos isoenzimas de glutamino sintetasa conocidas como GSI y GSII, sin embargo cuando se encuentran dentro de los nódulos como bacteroides fijadores de nitrógeno, el amonio producido por la nitrogenasa es exportado a las células de la planta. Con el objeto de estudiar la regulación genética de la asimilación de amonio en *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, tanto en bacterias de vida libre como en bacteroides, se identificaron, clonaron y caracterizaron, los genes estructurales *glnA* y *glnII* que codifican para las glutamino sintetasa I y II respectivamente, y el gene *glnT* que no se había identificado previamente y que codifica para una tercera isoenzima que llamamos GSIII. Lo anterior se logro a través de experimentos de complementación de cepas de *Klebsiella pneumonia* auxótrofas de glutamina, con un banco de genes de *R. l. phaseoli*, o por hibridización del genoma de *R. l. phaseoli* con genes estructurales de GS (*gln*) aislados de otras bacterias. A través de mutagenesis al azar de la cepa silvestre de *R. l. phaseoli* identificamos los genes reguladores *ntrB* y *ntrC* homólogos a los descritos en bacterias entéricas. Además demostramos que estos genes estan involucrados en la regulación de la síntesis de GSII y el la regulación de la actividad de GSI.



Indice

Contenido de la tesis.....	1
Introducción.....	2
La simbiosis <i>Rhizobium</i> -Leguminosa.....	3
Las vías de la asimilación de amonio en bacterias entericas.....	4
Mecanismos de regulación de la síntesis de glutamina.....	5
Regulación de la actividad de la glutamino sintetasa (GS).....	7
Regulación de la síntesis de GS.....	9
La vía de asimilación de amonio en bacterias de la familia <i>Rhizobaeaceae</i>	13
La glutamino sintetasa I (GSI).....	14
La glutamino sintetasa II (GSII).....	17
Glutamino sintetasa III (GSIII) en <i>Rhizobium</i>	19
Objetivos y antecedentes del proyecto de tesis.....	22
Resultados.....	24
Discusión.....	30
<i>glnA</i> y su producto la GSI.....	31
Regulación de la GSII.....	33
El gene <i>glnT</i> y su producto la GSIII.....	34
Significado de múltiples GSs en <i>Rhizobium</i>	35
Referencias.....	37

Contenido de la tesis

Esta tesis consiste de: i) un artículo que contiene los resultados obtenidos durante la realización de mi proyecto de doctorado que lleve a cabo en los años de 1983-1984, y que fue publicado en el año de 1985.

ii) debido a que han transcurrido varios años, en la introducción presento una revisión al día del tema, que contiene algunos resultados obtenidos en mi grupo, y iii) al final se incluye una discusión también al día de todos los resultados.

Introducción

La simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa

Las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son fijadoras de nitrógeno, y se pueden encontrar en el suelo (en vida libre) o como bacteroides dentro de los nódulos de las raíces de plantas leguminosas con las cuales forman asociaciones simbióticas. Las especies del género *Rhizobium* asimilan amonio para crecer en vida libre, pero en los nódulos el amonio producto de la fijación de nitrógeno es exportado a las células de la planta. La simbiosis entre bacterias del género *Rhizobium* y plantas leguminosas se puede visualizar como una complementación metabólica. La planta provee la energía en forma de fotosintato; los bacteroides sintetizan ATP a partir de estos compuestos a través de la respiración que tiene lugar a tensiones de oxígeno muy bajas (Appleby 1984) y sintetizan amonio que es asimilado por la planta (Bergerson and Turner 1967, O'Gara and Shanmugam 1976). Se han propuesto varios modelos para explicar como se lleva a cabo este intercambio (Brewin 1991, Layzell et al 1990, McDermot et al 1989, Mellor 1989, Minchin et al 1987, Vance and Heichel 1991, Witty et al 1986).

El establecimiento de la simbiosis es regulado por el nitrógeno (Streeter 1988). En presencia de nitrógeno combinado (nitrato o sales de amonio) se pueden observar multiples efectos inhibitorios sobre la simbiosis: i) sobre la infección de las raíces por *Rhizobium*, ii) sobre el número y tamaño de los nódulos, y iii) sobre la actividad de la nitrogenasa

en los nódulos. En presencia de concentraciones crecientes de amonio en el medio la eficiencia de la simbiosis se disminuye, hasta que a ciertas concentraciones la nodulación se inhibe completamente, de manera que cuando hay fertilizante en el suelo, no se fija nitrógeno, y se consume el fertilizante. La regulación de la simbiosis por nitrógeno combinado puede darse a través de la bacteria, de la planta, ó de ambos. Se ha estudiado principalmente el papel de la planta en el control de la simbiosis por nitrógeno. Se han aislado mutantes de plantas que son noduladas en presencia de altas concentraciones de nitrato (Carroll et al 1985) y se ha demostrado el papel de un factor del tallo en el control del nitrógeno sobre la formación de nódulos.

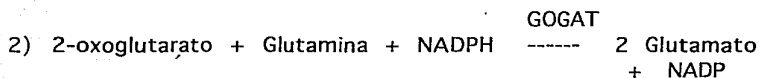
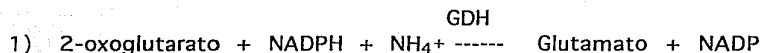
Recientemente se demostró que parte de esta regulación es a través de la bacteria. La expresión de genes de nodulación (*nodD* y *nodYABC*) de *Bradyrhizobium japonicum* es reprimida por amonio (Wang y Stacey 1990). Por otro lado en *Rhizobium meliloti* también se demostró que los genes *nodD3* y *nodABC* son regulados por amonio. Además, en esta bacteria el sistema *ntr* (más adelante se describe este sistema), y un locus cromosomal regulan la expresión de los genes de nodulación (Dusha et al 1989). Cuando se agregan 10 mg/planta de nitrato de amonio, se inhibe la fijación de nitrógeno en nódulos inducidos por algunas cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y no tiene efecto sobre los nódulos inducidos por otras cepas (Pate 1980). Cuando a plantas de frijol se les agregan 10 mg/planta de sulfato de amonio se inhibe la formación de nódulos inducidos por *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (Espín datos no publicados). Recientemente se aisló una mutante de *R. meliloti* que nodula en presencia de concentraciones de amonio que inhiben la nodulación en la cepa silvestre (Dusha et al 1989). La selección de

plantas mutantes que sean noduladas en presencia de nitrógeno en el suelo, sin duda mejorará la eficiencia de la simbiosis. El mejoramiento de la simbiosis se podría lograr también a través de la selección de cepas de *Rhizobium* una vez que la genética y la fisiología de su metabolismo nitrogenado se conozcan y entiendan mejor.

Un estudio sobre la regulación del metabolismo nitrogenado en *Rhizobium* debe considerar al menos tres estados fisiológicos: i) bacterias en vida libre que asimilan varios compuestos nitrogenados dependiendo si crecen en el suelo o en medios de cultivo en el laboratorio, ii) bacterias creciendo activamente dentro de la planta que se originan de una sola célula y que alcanzan hasta 10^9 células hijas, estas deben assimilar fuentes de nitrógeno que provee la planta, y cuya naturaleza se desconoce, iii) bacteroides totalmente diferenciados, estos se sabe que no se dividen, llevan a cabo poca síntesis de proteínas, tienen un alto contenido de nitrogenasa y fijan nitrógeno atmosférico.

Las vías de asimilación de amonio en bacterias entéricas

Las bacterias de la familia *Enterobaceae* asimilan el amonio del medio a través de la vía de la deshidrogenasa glutámica GDH (L-glutamato: NADP+ oxoreductasa EC 1.4.1.4.) que cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato por amonio (reaccion 1), o de la vía de la glutamato sintasa GOGAT (L-glutamato:NADP+ oxidoreductasa EC2.6.1.53) que transfiere el grupo amido de la glutamina al 2-oxoglutarato para formar dos moléculas de glutamato (reaccion 2), y la glutamino sintetasa GS (L-glutamato:aminoliasa EC 6.3.1.2.) (reaccion 3)



La GDH tiene una baja afinidad por amonio (K_m de 1 mM) de manera que opera en altas concentraciones de amonio (Magasanik 1982). La GOGAT de *Escherichia coli* tiene una alta afinidad por glutamina (K_m de 0.2 mM) (Matzala y Zalkin 1976) La vía GS/GOGAT es la que opera para asimilar el amonio cuando este es limitante. En las bacterias entéricas el uso de estas dos vías de la asimilación del amonio se controla a nivel genético en respuesta a la disponibilidad del nitrógeno en el medio.

Mecanismos de regulación de la síntesis de glutamina.

La glutamina el producto de la actividad de la GS juega un papel clave en el metabolismo celular, es el precursor en la síntesis de compuestos nitrogenados como algunos aminoácidos, purinas, pirimidinas, aminoazúcares, etc. ver la figura 1. En las bacterias entéricas la GS esta codificada por el gene *glnA*, y la enzima es un dodecámero de subunidades idénticas de alrededor de 50 kDa . La GS es una enzima muy regulada: a nivel de su actividad y de su síntesis.

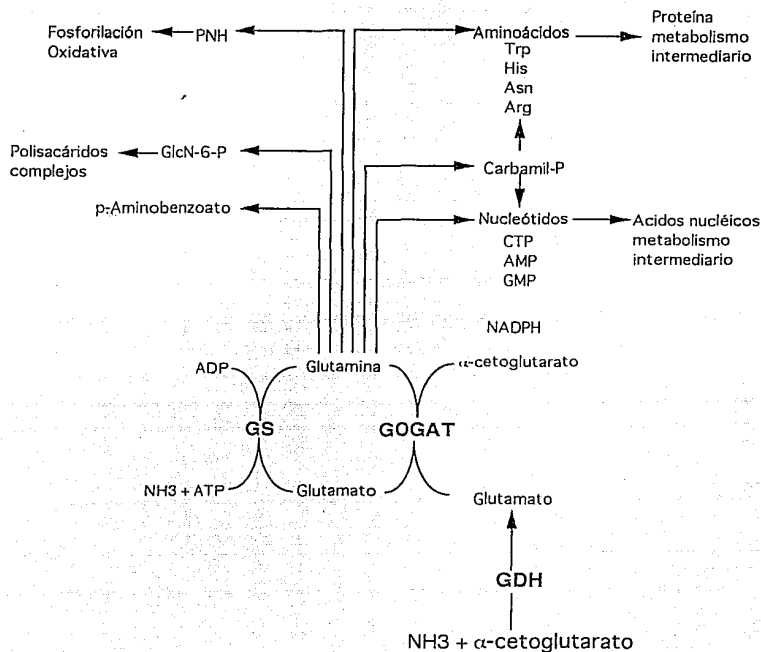


Figura 1. Vías de asimilación de amoníaco en enterobacterias para la producción de glutamato y glutamina y algunos de los papeles de estos compuestos en el metabolismo intermedio.

Regulación de la actividad de la GS.

se conocen al menos tres mecanismos que regulan la actividad de la GS: i) inhibición por retroalimentación por diferentes productos del metabolismo de glutamina. ii) Inactivación en respuesta a ciertas concentraciones de iones divalentes, y iii) por modulación de su actividad a través de adenilar (inactivar) o desadenilar (activar) cada una de las doce subunidades (Ginsburg y Stadman 1973, Stadman et al 1980, Meister, 1980, Rhee et al 1985, Stadman 1990). La regulación de la actividad por este último mecanismo se logra a través de la acción de tres proteínas: una enzima bifuncional uridiltransferasa/desuridilasa (UTasa) codificada por el gene *glnD*; la proteína regulatoria P_{II} que es un tetrámero de subunidades idénticas de 11 kDa codificada por el gene *glnB*; y una adeniltransferasa que cataliza la adenilación o desadenilación de la GS en un residuo de tirosina en la posición 357 de cada monómero, y esta codificada por el gene *glnE*. La disponibilidad de nitrógeno en el medio se refleja en la relación intracelular de glutamina/2-oxoglutarato (Stadman et al 1980, Stadman 1990). Cuando a un cultivo de bacterias creciendo en un medio limitante de amonio se le agrega un exceso de amonio, se causa un aumento en la relación glutamina/2-oxoglutarato, esto inicia una cadena de eventos que resultan en la activación de la UTasa que desuridila a la proteína P_{II}, y esta a su vez interacciona con la adeniltransferasa, que adenila a la GS. En células creciendo en un medio limitado de amonio, la relación glutamina/2-oxoglutarato es baja lo que dispara el reverso de las reacciones descritas, causando en última instancia la desadenilación de la GS. (ver la figura 2)

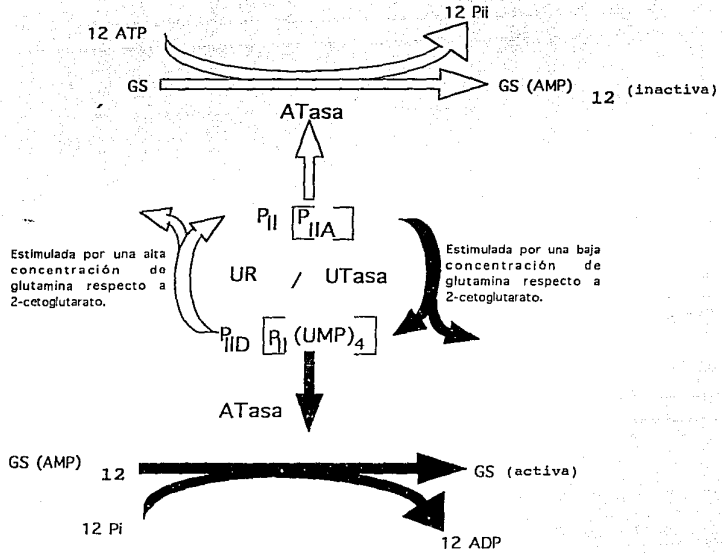


Figura 2. Modificación covalente de la glutamina sintetasa (adenilación de la GS). UR/Utasa, Uridiltransferasa; ATasa, adeniiltransferasa.

Regulación de la síntesis de la GS.

En las enterobacterias el gene estructural de la GS *glnA*, forma parte de un operón que incluye a los genes reguladores *ntrB* y *ntrC*. Este operón *glnA-ntrBC* tiene tres promotores (figura 3) *glnAp1* y *glnAp2*, localizados en el extremo 5' del gene *glnA* y el promotor *ntrBp* situado en la región intergénica de *glnA* y *ntrB*.

La transcripción de *glnA* a partir del promotor *glnAp2* se regula en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en el medio a través de la acción de las proteínas UTasa, P_{II}, NtrB, codificada por el gene *ntrB*, NtrC codificada por *ntrC*, y el factor σ -54 de la RNAPolimerasa, codificado por el gene *ntrA* o *rpoN*. La proteína NtrB es una quinasa que se autofosforila en un residuo de histidina, y transfiere el fosfato a la proteína NtrC en un residuo de aspartico, situado en el dominio terminal (Weiss y Magasanik 1988, Keener y Kustu 1988). *ntrB* y *ntrC* pertenecen a una familia de genes reguladores de dos componentes que captan y transducen señales del medio ambiente al interior de la célula (Nixon et al 1986, Albright et al 1989).

En condiciones de limitación de amonio, la UTasa que sensa una relación baja de glutamina/2-oxoglutarato, uridila a la proteína P_{II}; P_{II}-UMP favorece la fosforilación de la proteína NtrC por NtrB (Keener y Kustu 1988), y la proteína NtrC-P activa la transcripción de *glnAp2*. Cuando se agrega un exceso de amonio, la UTasa convierte P_{II}-UMP en P_{II}, la cual promueve la defosforilación de NtrC-P catalizada por NtrB, lo cual finalmente resulta en una disminución en la síntesis de GS (Reitzer y Magasanik 1987). (ver la figura 4).

La transcripción del gene *glnA* a partir del promotor *glnAp2* lo lleva a

cabo la RNA polimerasa que contiene al factor σ -54. Este factor confiere a la RNAPolimerasa especificidad para reconocer promotores con una

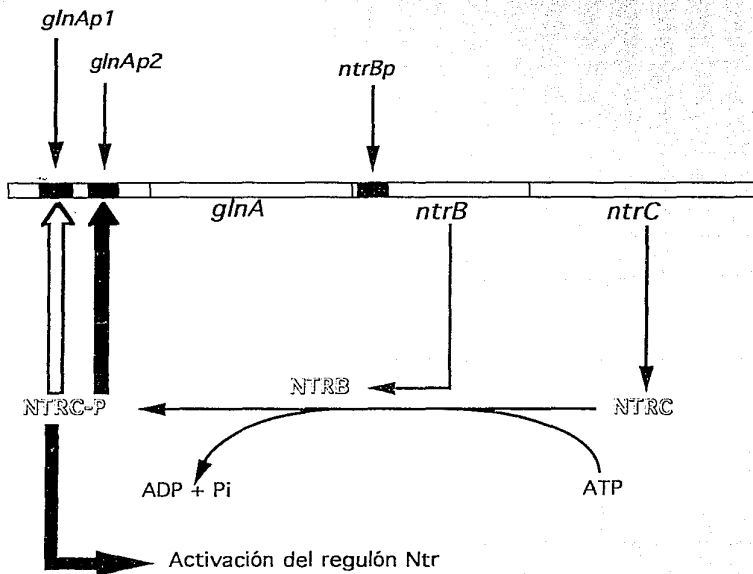


Figura 3. Organización genética del operón *glnA-ntrBC* en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. La flecha sólida indica la regulación positiva y la flecha vacía indica regulación negativa.

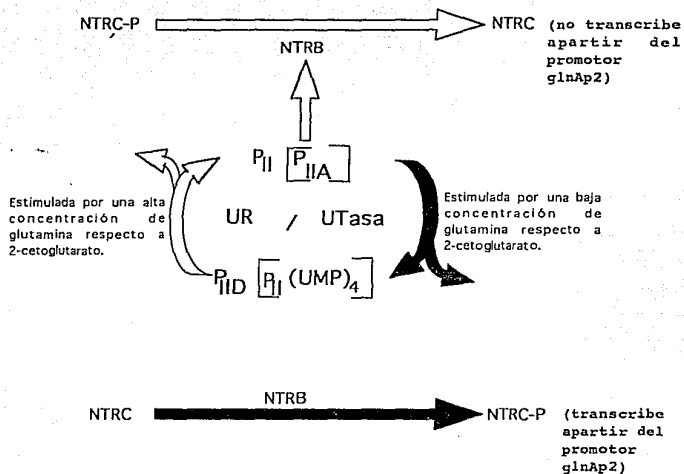


Figura 4. Mecanismo de regulación transcripcional del gene *glnA* (que codifica para GS), en respuesta al contenido de nitrógeno intracelular. UR/Utasa, Uridiltransferasa; NTRB, modulador, NTRC efector.

secuencia consenso específica GG-n10-GC que se localiza 11 a 14 pares de bases arriba del sitio de inicio de la transcripción, esta secuencia se encuentra en el promotor *glnAp2*, y en otros promotores de genes que codifican proteínas del metabolismo nitrogenado, como los genes de la fijación del nitrógeno (*nif*). Los promotores que contienen esta secuencia se conocen como promotores *ntr* (Thony y Hennecke 1989). Esta secuencia consenso constituye el sitio de unión de la polimerasa con el factor σ -54. La proteína NtrC se une a regiones reguladoras en el promotor localizadas a más de 100 pares de bases hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción conocidas como UAS (Reitzer y Magasanik 1986, Popham et al 1989). Estos sitios de unión para NtrC, tienen propiedades similares a los de los enhancers en eucariotes, o sea que funcionan a larga distancia para mejorar la transcripción. Estos sitios de unión funcionan para unir NtrC al promotor, dando como resultado un aumento en la concentración del activador en la región donde actúa. NtrC contacta complejos cerrados entre la RNA-polimerasa con σ -54 y el promotor de *glnA* a través de un doblamiento del DNA (Wedel et al 1990). Los "loops" del DNA que se forman por el contacto de estas dos proteínas se han visualizado en el microscopio electrónico (Wen Su et al 1990). Para activar la transcripción, pero no para unirse al DNA, NtrC debe estar fosforilado. En resumen el mecanismo de activación se esquematiza en la figura 5: NtrC cataliza la isomerización de complejos cerrados de reconocimiento entre la RNA polimerasa y el promotor, a complejos abiertos transcripcionalmente activos, en los cuales las cadenas son localmente desnaturalizadas alrededor del sitio de inicio de la transcripción y la cadena correcta puede servir como templado para la síntesis de RNA, la reacción de isomerización depende de ATP (Kustu et al

1989, Popham et al 1989).

La transcripción a partir de los promotores *glnAp1* y *ntrBp* se lleva a cabo por la polimerasa que contiene el factor σ^{-70} , ya que tienen la secuencia consenso -10 -35 típica de promotores de bacterias entéricas. La transcripción a través del promotor *glnAp1* es reprimida por NtrC (Reitzer y Magasanik 1985), y es activada por la combinación de AMPc y CRP. Este es un promotor débil que mantiene niveles bajos de transcripción de *glnA* en condiciones de exceso de nitrógeno y limitación de carbono.

La vía de asimilación de amonio en bacterias de la familia *Rhizobaceae*.

Las especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son bacterias del suelo que fijan nitrógeno atmosférico cuando están en simbiosis con plantas leguminosas. En vida libre estas bacterias asimilan el amonio del medio para crecer exclusivamente a través de las actividades de la vía GS-GOGAT, ya que carecen de la actividad de la deshidrogenasa glutámica GDH (Brown y Dilworth 1975, Ludwig 1980, Bravo y Mora 1988), sin embargo en la simbiosis el amonio producto de la fijación de nitrógeno es exportado fuera de la bacteria y es asimilado por la planta, lo que indica que existen mecanismos distintos que regulan la asimilación de amonio en bacterias de vida libre y en bacteroides fijadores de nitrógeno. Otra característica de las especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* es que poseen dos isoenzimas de glutamino sintetasa conocidas como GSI y GSII (Darrow y Knotts 1977, Fuchs y Keister 1980).

La glutamino sintetasa I (GSI)

La GSI codificada por el gene *glnA* es parecida a la GS de las bacterias entéricas, es una enzima polimérica compuesta de doce subunidades idénticas de alrededor de 52 kDa, es relativamente estable al calor y es adenilada (Darrow 1980). El gene *glnA* de *R. leguminosarum* biovar *viciae* se ha clonado y secuenciado (Filser et al 1986, Collona-Romano et al 1987), la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia del DNA es 56, 63, y 68% similar con las secuencias de aminoácidos deducidas de las glutamino sintetetasas de *Anabaena*, *E. coli* y *Azospirillum brasilense* respectivamente. En *R. meliloti* (Szeto et al 1987) *R. leguminosarum* biovar *viciae* (Rossi et al 1989), y *B. japonicum* (Carlson et al 1985), la transcripción de *glnA* parece ser constitutiva, de hecho la GSI se regula a nivel de su actividad por el mecanismo de adenilación, que en *R. leguminosarum* biovar *viciae* se demostró que inhibe la actividad biosintética y al igual que en bacterias entéricas se encontró altamente adenilada en células creciendo en exeso de amonio y pobremente adenilada en células creciendo en un medio con amonio limitante (Rossi et al 1989). En *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* encontramos que aunque la GSI se adenila el mecanismo de adenilación no parece responder al contenido de amonio presente en el medio, ya que encontramos niveles de adenilación similares en células creciendo en exeso o limitacion de amonio (Noguez 1992). Aunque la actividad de GSI se regula por adenilación poco se sabe de los genes que participan en este mecanismo en *Rhizobium*. Un gene *glnB* homólogo al reportado en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* se encuentra junto al extremo 5' del gene *glnA* en *R. leguminosarum* biovar *viciae* (Collona-Romano et al 1987, Holtel et al 1989), en *B. japonicum* (Martin et al 1989), y en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Espín G. resultados no

publicados). El gene *glnB* de *R. leguminosarum* biovar *viciae* tiene un promotor *ntr*, y se ha encontrado la presencia de un transcrito *glnB-glnA*, así como uno *glnA* (Chirazzi y Iaccarino, 1990). El gene *glnB* de *B.*

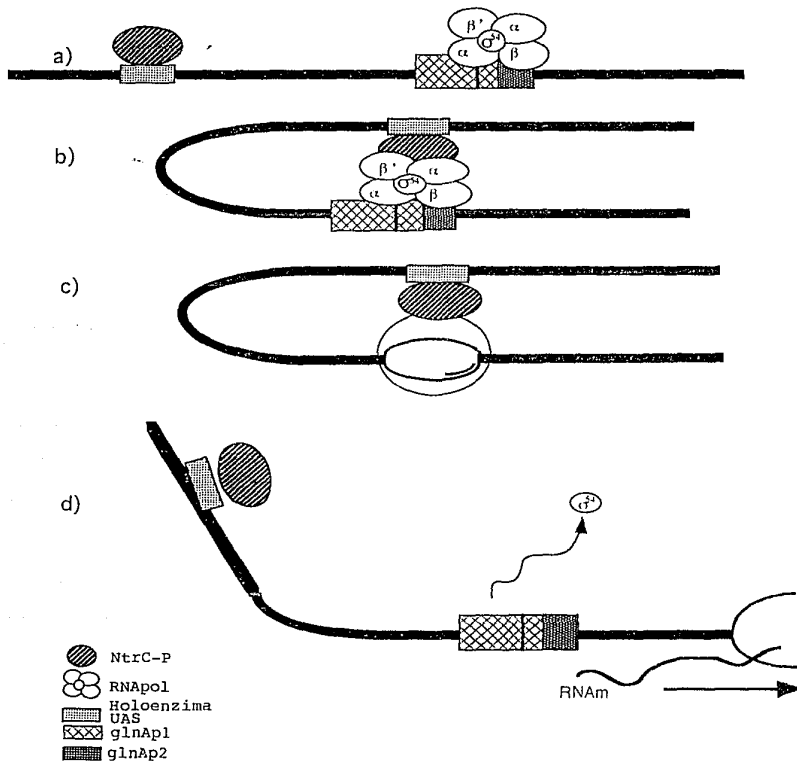


Figura 5. Mecanismo de acción de NtrC-P para activar los promotores regulados por nitrógeno. a) Interacción de NtrC-P (activo) con la secuencia UAS. b) Doblamiento del DNA y la interacción de NtrC-P con la RNAPol holoenzima (core- σ^{54}). c) Formación del complejo cerrado en complejo abierto y d) elongación del transcrito.

japonicum se transcribe a partir de promotores en "tandem", uno de los cuales es promotor *ntr*, sin embargo, no se sabe nada del papel de *glnB* en la regulación de la adenilación de GSI ni en la regulación de la fosforilación de NtrC. En *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* mutantes con inserciones de Tn5 en el gene *ntrC* tienen niveles reducidos de la proteína P_{II} (Moreno et al 1992) y la adenilación de la GSI esta también muy reducida en estas mutantes (Noguez 1992). Se han aislado mutantes por inserción de transposones o genes de resistencia a antibióticos en el gene *glnA* es decir mutantes GSI- en *R. meliloti* (Somerville y Khan 1983) en *B. japonicum* (Carlson et al 1987) y en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Moreno et al 1991). Estas mutantes crecen en amonio como fuente única de nitrógeno debido a la presencia de la GSII.

Con respecto a la presencia de la actividad de GS en los bacteroides Brown and Dilworth (1975) demostraron la presencia de una actividad de GS en bacteroides de varias especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, sin embargo en ese tiempo, se desconocía la presencia de dos isoformas de GS. En ese mismo estudio la actividad de GS de los bacteroides se encontró muy baja comparada con la GS presente en las células de la planta. En un estudio más reciente Shatters et al (1989) utilizando anticuerpos específicos contra la proteína de GSII no detectaron dicha proteína en extractos crudos de nódulos de alfalfa, chícharo o soya. En mi laboratorio determinamos la actividad de GS en bacteroides aislados de nódulos inducidos por la cepa silvestre de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* y de nódulos inducidos por una mutante GSI-; en los bacteroides de la cepa silvestre detectamos solo actividad de GSI, en la mutante no se detectó ninguna actividad de GS (Moreno et al 1991). Todos estos datos sugieren que la GSI y no la GSII esta presente en bacteroides. En simbiosis las

mutantes *glnA*⁻ (GSI⁻) de *R. meliloti* nodulan y fijan nitrógeno igual que la cepa silvestre (Somerville y Khan 1983); las mutantes *glnA*⁻ de *B. japonicum* inducen un número mayor de nodulos por planta que fijan más nitrógeno que la cepa silvestre (Carlson et al 1987); la mutante *glnA*⁻ de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* nodula pero fija solo un 50% del nitrógeno que fija la cepa silvestre (Moreno et al 1991).

La glutamino sintetasa II (GSII)

La GSII esta codificada por el gene *glnII*. La GSII es un octámero compuesto por subunidades de alrededor de 36 Kda, y es sensible al calor, se inactiva completamente cuando se incuba 1 hora a 50 °C (Darrow 1980). El gene *glnII* de *B. japonicum* se ha clonado y secuenciado (Carlson and Chelm 1986). La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia DNA con otras glutamino sintetetasas, mostró que la GSII comparte poca homología con glutamino sintetetasas bacterianas y mucha con glutamino sintetetasas de plantas, como la GS de *Phaseolus vulgaris* y de animales (Carlson and Chelm 1986, Shatters y Khan 1989). En mi grupo clonamos el gene *glnII* *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, la expresión de este gene en *E. coli* depende del sistema *ntr* (Espin G. datos no publicados). A diferencia de la GSI, los niveles de la actividad de GSII varían en bacterias creciendo en medios con diferentes fuentes de nitrógeno (Darrow 1980, Howitt y Gresshof 1985, Martin et al 1988, Bravo y Mora 1988, Espín et al 1990, Moreno et al 1992), o diferentes concentraciones de oxígeno (Rao et al 1978, Adams y Chelm 1988). El efecto de oxígeno y la fuente de nitrógeno sobre los niveles de actividad de GSII se ha demostrado que es a nivel de la transcripción del gene *glnII*. Los genes *glnII* de *B. japonicum* y *R. meliloti* tienen promotores *ntr* (Martin et al

1988, Shatters et al 1989) y su transcripción es regulada por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo (Martin et al 1988, Adams and Chelm 1988, de Bruijn et al 1989). De hecho la transcripción del gene *glnII* en *R. meliloti*, *B. japonicum*, y *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* depende de la presencia de los genes *ntrC* (de Bruijn et al 1989, Martin et al 1988, Moreno et al 1992) y *ntrA* (Ronson et al 1987, Shatters et al 1989). En *B. japonicum* el gene *ntrC* se requiere para la expresión de *glnII* en condiciones de crecimiento aeróbico limitado de nitrógeno, pero no en bacterias limitadas de oxígeno, ni en bacteroides. En *B. japonicum* la inducción de GSII bajo condiciones de limitación de oxígeno, depende del gene *nifA* cuyo producto activa la transcripción de los genes de la nitrogenasa (Martin et al 1988).

Se han aislado y caracterizado mutantes estructurales de GSII en *R. meliloti* (de Bruijn et al 1989, Somerville et al 1989), *B. japonicum* (Carlson et al 1987), y en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Moreno y Espín datos no publicados). de Bruijn et al (1989) construyeron una mutante de *R. meliloti* con una fusión del gene *lacZ* de *E. coli* en el gene *glnII*, esta mutante (*glnII::lacZ*) es capaz de crecer en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno de manera similar a la cepa silvestre, es también capaz de nodular y fijar nitrógeno. En nódulos inducidos con esta mutante no se detecta actividad de beta-galactosidasa.

A diferencia de lo que se encontró en *R. meliloti* en nódulos inducidos por una cepa silvestre de *B. japonicum*, si se detecta transcrito de *glnII*, y el nivel de este transcrito es similar al encontrado en bacterias cultivadas en microaerofilia (Adams y Chelm 1988).

La nodulación y la fijación de nitrógeno de las mutantes GS- de *R. meliloti* son similares a la cepa silvestre (de Bruijn et al 1989, Somerville et al

1989). La mutante GSII- de *B. japonicum* induce un número de nódulos mayor y la fijación de nitrógeno esta también aumentada (Carlson et al 1987).

Se han aislado dobles mutantes *glnA-glnII-* de *R. meliloti* y *B. japonicum*. Las dobles mutantes de *R. meliloti* nodulan y fijan nitrógeno (Nod+ Fix+) como la cepa silvestre (Somerville et al 1989), mientras que las mutantes de *B. japonicum* no nodulan ni fijan nitrógeno (Nod- Fix-) (Carlson et al 1987). En *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* hemos tratado sin éxito, de contruir una doble mutante *glnA-glnII-* debido posiblemente a que auxotrofos de glutamina de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* no son viables (Moreno y Espín datos no publicados)

Glutamino sintetasa III (GSIII) en *Rhizobium*.

Recientemente de Bruijn et al (1989) clonaron un fragmento *Bam*HI de 11.2 kb del genoma de *R. meliloti*. El plasmido resultante pFB6162 complementa la auxotrofia de glutamina de cepas *glnA-* de *E. coli*. Este fragmento de DNA no hibridiza con los genes *glnA* y *glnII* por lo cual se denominó *glnT*, al locus responsable de esta complementación. La mutagénesis con Tn5 del fragmento *Bam*HI de 11.2 kb delimitó el locus *glnT* a una región de aproximadamente 5 kb. Esta región codifica para cinco polipéptidos de 57, 48, 38, 29, y 28 Kda, por lo que se sugirió que el locus *glnT* es un operón que consiste de varios genes involucrados en la biosíntesis de glutamina. Estos autores sin embargo no detectaron ninguna actividad de GS en las cepas complementadas.

Utilizando el plasmido pFB6162 como detector en un experimento de hibridación tipo Southern, identificamos y clonamos un fragmento *Bam*HI de 12 kb que contiene al locus *glnT* de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*;

este fragmento no hibridiza con los genes estructurales de la GSI y la GSII del mismo *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*. El plasmido pMW5a que contiene el fragmento *Bam*HI de 12 kb, complementa la auxotrofia por glutamina de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* con mutaciones en el gene *glnA*, debido a que expresa el locus *glnT* a partir de un promotor del vector. Las cepas complementadas poseen una actividad de glutamino sintetasa (GSIII), con características catalíticas que la distinguen de otras GSs por ejemplo posee una relación de actividad biosintética/transferasa 103 veces mayor que la observada para la GSI o la GSII de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*. Buscamos una actividad de GSIII en varias cepas de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (silvestre, GSI-, GSII-, NtrC-) crecidas en diferentes condiciones en vida libre y en bacteroides y no la detectamos. Tratamos de transferir el plasmido pMW5a a varias cepas de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* para determinar la presencia de GSIII en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*. Con todas las cepas utilizadas aparecían transconjugantes como pequeñas colonias en medios suplementados con los antibióticos apropiados, pero estas ya no crecían al ser sembradas al mismo medio selectivo. Este y otros resultados nos llevaron a concluir que la expresión de GSIII a partir de un promotor del vector causa la inhibición del crecimiento y que este efecto tóxico puede ser el resultado de la alta actividad biosintética de esta enzima (Espin et al 1990). La actividad de GSIII se purificó a partir de una cepa *glnA*- de *K. pneumoniae* complementada con el locus *glnT*. La caracterización bioquímica de la enzima pura reveló que esta compuesta de un solo polipéptido de 51 kDa con un punto isoeléctrico de 6.2. Se determinaron las afinidades de la enzima pura por ATP (K_m 0.08 mM), glutámico (K_m 5.3 mM) e hidroxilamina (K_m 15.5 mM), se encontró que la afinidad por ATP es 10 veces mayor que

la de la GS de *E. coli*. Por el método de degradación de Edman se determinó la secuencia de ocho aminoácidos del extremo N-terminal (Met-Thr-Leu-Asp-Leu-Ala-Ala-Phe). Utilizando anticuerpos contra la GSIII pura no se detectó la presencia de esta proteína en extractos crudos de cepas de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* crecidas en vida libre ni en bacteroides. Por medio de mutagenesis con el transposon Tn5 se delimitó al locus *glnT* a un fragmento *Bam*HI de 2.4 kb. al cual se le determinó la secuencia de nucleótidos. El análisis de esta secuencia reveló un marco abierto de lectura cuyos ocho primeros aminoácidos corresponden a ocho aminoácidos determinados en la proteína pura, la masa molecular de la proteína deducida de la secuencia es de 48,276 que concuerda con el valor de 51,000 determinado experimentalmente para la GSIII. Estos resultados nos permiten concluir que *glnT* es el gene estructural de la GSIII y que *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* posee tres genes que codifican para tres diferentes GSs.

Antecedentes y objetivos del proyecto de tesis

El objetivo del proyecto realizado durante mis estudios de doctorado fué el estudio de la regulación genética de la asimilación de amonio en *Rhizobium phaseoli* (ahora reclasificado como *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*), específicamente la regulación de las glutamino sintetetasas I y II y su papel en la fijación de nitrógeno. En ese entonces poco se conocía de la regulación genética de la asimilación de amonio y de la fijación de nitrógeno durante la simbiosis, en especies de *Rhizobium*, sin embargo la regulación genética de la fijación de nitrógeno y de la asimilación de amonio de la bacteria *K. pneumoniae* (que fija nitrógeno en vida libre) se conocía ya con bastante detalle (Espín 1984, revisión). Se sabía ya que el regulón *nif* consistía de 17 genes organizados en 8 unidades transcripcionales (Kennedy et al 1980), que la expresión de estos genes estaba regulada a dos niveles: un nivel general mediado por los genes *ntxB* y *ntxC* cuyos productos controlan la síntesis de enzimas que se requieren para la asimilación de una gran variedad de fuentes de nitrógeno incluyendo a la glutamino sintetasa (Espín et al 1982). *ntxB* y *ntxC* también se requieren para activar la transcripción del operón *nifLA* (Dixon et al 1980). El segundo nivel mediado por los productos de los genes reguladores *nifA* y *nifL* que controlan la expresión del resto de los genes *nif* que incluye al operón *nifHDK* que codifica para los polipéptidos de la nitrogenasa (Dixon et al 1980, 1984). En *K. pneumoniae* los genes *ntxB* y *ntxC* están localizados abajo del gene *glnA* con el cual forman una unidad transcripcional, de manera que mutaciones en *glnA* son polares sobre estos genes y producen un fenotipo Nif⁻ (Espín et al 1981, 1982).

Se conocía ya la existencia de las glutamino sintetetasas I y II en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Existían también dos reportes sobre

mutaciones en *R. meliloti* (Kondorosi et al 1977), y en *Rhizobium* sp Cowpea (Ludwig y Singer 1977) que alteran la síntesis de glutamina Gln- y producen un fenotipo Fix-. Esto sugería la presencia en *Rhizobium* de genes reguladores comunes de la fijación de nitrógeno y la asimilación de amonio análogos a los genes *ntr* descritos en enterobacterias. Se sabía también que en *R. meliloti* mutaciones polares en *glnA* el gene estructural de GSI no afectaban la fijación de nitrógeno (Somerville y Kahn 1983) lo que sugería la ausencia de genes *ntr* ligados al gene *glnA*. Otro dato que sugería la presencia de genes *ntr* en *Rhizobium* es que se había identificado en *R. meliloti* un gene regulador *nifA* análogo al descrito en *K. pneumoniae* (Szeto et al 1984).

El objetivo específico del proyecto de tesis es la identificación de genes reguladores de la síntesis de glutamina y de la fijación de nitrógeno (?), a través de el aislamiento de mutantes de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* con alteraciones en la síntesis de glutamina y la determinación de su capacidad para fijar nitrógeno.

Se hicieron dos experimentos de mutagenesis química y con transposones con el objeto de aislar mutantes auxótrofos de glutamina, sin embargo no se obtuvieron dichos auxótrofos. Estos resultados nos sugerían que en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* se requería mas de una mutación para obtener dicho fenotipo debido posiblemente a la presencia de dos genes de GS. Por lo que decidí cambiar de estrategia. La estrategia utilizada consistió en aislar mutantes sensibles a metionina sulfoximina (MS) que es un inhibidor específico de la glutamino sintetasa. La hipótesis que se proponía suponía que un fenotipo MS^s sería resultado de la pérdida o de la disminución de la actividad de alguna de las dos GSs. Los resultados obtenidos se resumen en el artículo que a continuación se presenta.

Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximine sensitive (MS^s) mutants of *Rhizobium phaseoli*

Enrique Morett, Soledad Moreno, and Guadalupe Espin

Centro de Investigacion sobre Fijacion de Nitrogeno, UNAM, Apdo Postal 565-A, Cuernavaca Mor., Mexico

Summary. Random Tn5 mutagenesis of antibiotic-resistant derivatives of *Rhizobium phaseoli* CFN42 yielded several independent mutants that were sensitive to methionine sulfoximine (MS^s), a specific inhibitor of glutamine synthetase (GS). These MS^s mutants were analyzed for GSI and GSII activities and for their symbiotic properties. Four classes of MS^s mutants have been distinguished. Class I strains are impaired in their synthesis of glutamine and in their symbiotic properties. Class II strains have wild type levels of GSI and GSII activities but have a reduced capacity to fix nitrogen. Class III strains have lost GSII activity, but their symbiotic properties are wild type. In class IV mutants neither glutamine synthesis nor symbiotic properties are affected. Mutants of classes I, III, and IV all have the Tn5 inserted into the chromosome, whereas in class II mutants the Tn5 is located in plasmid p42e, a plasmid different from the previously identified symbiotic plasmid p42d.

Introduction

Bacteria of the genus *Rhizobium* have a symbiotic interaction with leguminous plants. This results in the formation of specialized structures, the nodules, in which the bacteria differentiate into bacteroids and fix nitrogen (for a review see Verma and Long 1983). At present little is known about the regulation of nitrogen fixation during this symbiosis. In contrast the regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of the free-living, nitrogen fixing organism *Klebsiella pneumoniae*, has been studied extensively. The *K. pneumoniae* *nif* cluster consists of 17 genes organized into 7 or 8 operons (for review see Kennedy et al. 1981; Roberts and Brill 1981; Beynon et al. 1983). Expression of this gene cluster is regulated at two levels: the first level involves a general nitrogen regulation system mediated by the products of the *ntrA* and *ntrC* genes. The second level involves the specific control of *nif* operons by the *nifA* and *nifL* gene products (Dixon et al. 1980; Buchanan-Wollaston et al. 1981a, b; Hill et al. 1981; Merrick et al. 1982). The products of the *ntrA* and *ntrC* genes exert a general control on the synthesis of enzymes required for assimilation of a wide variety of nitrogen sources including glutamine synthetase (GS) (Espin et al. 1982; de Bruijn and Ausubel 1983; Ow and

Ausubel 1983; Merrick 1983). They also are required to activate the *nifLA* promoter (Ow and Ausubel 1983; Drummond et al. 1983; Merrick 1983; Dixon et al. 1984). The *nifA* product in turn activates transcription of all other *nif* operons including the *nifHDK* operon encoding the nitrogenase polypeptides (Dixon et al. 1980; Buchanan-Wollaston et al. 1981a). The *ntrC* gene is located downstream of *glnA*, the structural gene of GS. Some mutations in *glnA* are polar to *ntrC* and therefore produce a Nif⁻ phenotype (Espin et al. 1981, 1982; de Bruijn and Ausubel 1981).

Rhizobia possess two forms of GS. GSI is similar to that of enteric bacteria, whereas the heat-labile GSII is specific to the Rhizobaceae (Darrow and Knotts 1977). In *Rhizobium meliloti* (Kondoroski et al. 1977) and in *Rhizobium* sp "Cowpea" 32111 (Ludwig and Singer 1977) mutations that alter glutamine synthesis (Gln⁻) produce a Fix⁻ phenotype. This suggested that GS participates in the regulation of nitrogenase expression. However, the demonstration in *K. pneumoniae* that *glnA* is required not for expression of the *nif* regulon but the *glnA*-linked *ntrC* regulatory gene (Espin et al. 1982) raises the question of whether in *Rhizobium* GSI and/or GSII actually have a role in the regulation of nitrogen fixation or whether this role is played by *ntr*-like genes analogous to those described in *K. pneumoniae*. Studies with revertants of the *Rhizobium* sp 32111 Gln⁻ mutants, showed that loss of GSII activity does not result in a Fix⁻ phenotype (Ludwig 1980) and more recently Sommerville and Kahn (1983) reported that in *R. meliloti* an insertion mutation in the structural gene of GSI, does not affect nitrogen fixation, indicating that GSI is not involved in the regulation of nitrogen fixation; this result also suggests the absence of a *ntr*-like regulatory gene closely linked to *glnA* GSI. However, evidence for the presence of a *ntr*-like regulatory system in *Rhizobium* is the finding of a *nifA*-like regulatory gene in *R. meliloti* (Zimmerman et al. 1983; Szeto et al. 1984). A Tn5 insertion mutant in *nifA* failed to accumulate *nifHDK* mRNA or nitrogenase polypeptides (Zimmerman et al. 1983). In addition this gene hybridizes to the *K. pneumoniae* *nifA* and to the *Escherichia coli* *ntrC* regulatory genes (Szeto et al. 1984).

In this study we describe the isolation and characterization of Tn5 insertion mutants in which the synthesis and/or regulation of GS enzymes has been altered. This was accomplished by isolating mutants sensitive to methionine sulfoximine (MS^s) a specific inhibitor of GS. The symbiotic properties of these mutant strains have been analyzed to determine

the possible role of genes controlling GS activity in the regulation of nitrogen fixation.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids. Strains and plasmids are listed in Table 1.

Media. All media were as described by Noel et al. (1984). Antibiotics used were: Kanamycin (Km), 30 µg/ml; Rifampicin (Rif), 25 µg/ml; Chloramphenicol (Cm), 20 µg/ml; Tetracycline (Tc), 10 µg/ml; Ampicillin (Ap), 50 µg/ml; Streptomycin (Sm), 200 µg/ml.

Tn5 mutagenesis. pSUP 1011 and pSUP 5011, mobilizable "suicide" plasmids carrying Tn5 and Tn5 mob, respectively,

(Simon et al. 1983) were mobilized into *R. phaseoli* strains CE3 or CE2 (Table 1). Matings were done on PY medium plates overnight at 30° C, the cells were resuspended in sterile water and plated on selective medium. Tn5 mutagenesis was also performed with plasmid pJB4 JI as described by Noel et al. (1984).

Plasmid analysis. Plasmid DNA was separated on 0.7% agarose gels according to the Eckhardt (Eckhardt 1978), or Hirsh procedures (Hirsh et al. 1980).

DNA hybridization. Southern blot hybridization experiments were carried out as described by Quinto et al. (1982).

Molecular cloning. Total EcoRI-digested *R. phaseoli* DNA was ligated into the EcoRI site of pBR328 or pBR329, according to Quinto et al. (1982). Ligated DNAs were transformed in *E. coli* HB101.

Glutamine synthetase activities. Cultures were grown to an OD_{540 nm} of 0.3 in minimal medium supplemented with 1 mg/ml glutamate and succinate as nitrogen and carbon sources. Cells were harvested and resuspended in buffer containing 10 mM Imidazole and 1 mM MnCl₂ pH 7.0; GSI and GSII transferase activities were determined by the method of Bender et al. (1977), using their different heat stabilities at 50° C to distinguish between them. (Darrow and Knotts 1977).

Nodulation tests and acetylene reduction activities. *Phaseolus vulgaris* c.v. negro jamaica surface-sterilized seeds were inoculated into 250 ml Erlenmeyer flasks with 175 ml nitrogen-free plant nutrient (Waeck and Brill 1976) and 0.8% agar. After germination (2 or 3 days), seedlings were inoculated with 0.5 ml liquid *R. phaseoli* culture. After 15 days incubation in a growth chamber, nodulation was scored and nitrogenase activity was determined by measuring acetylene reduction of nodulated plant roots.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain/plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Rhizobium phaseoli</i>		
CNF42	Wild type	Quinto et al. (1982)
CE3	Sm ^r derivative of CFN42	Noel et al. (1984)
CE2	Rif ^r Cm ^r derivative of CFN42	Noel et al. (1984)
CFN2001	CFN42 derivative cured of p42a and p42d plasmids	Palacios et al. (1984)
CFN2011	Mutants isolated after transfer of pSUP 1011 to strain CE3	This work
CFN2012		
CFN2013		
CFN2014		
CFN2017		
CFN2018	Mutant isolated after transfer of pJB4J1 to strain CE3	This work
CFN2026	Mutant isolated after transfer of pSUP5011 to CE2 strain	This work
CFN2025	CFN2013 derivative cured of plasmid p42d	This work
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
CS8C1	Fry ^r Cm ^r	Holsters et al. (1980)
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	recA hsdR hsdM Sm ^r pro leu	Boyer and Roulland-Dussoix (1969)
<i>Plasmid</i>		
pJB4J	IncP Gen ^r Cm ^r Sp ^r Mu::Tn5	Beringer et al. (1978)
pJB3	R68.45 Km ^r Cm ^r Ap ^r	Brewin et al. (1980)
pBR328	Cm ^r Tc ^r Ap ^r	Soberon et al. (1980)
pBR329	Cm ^r Tc ^r Ap ^r	Covarrubias and Bolivar (1982)
pBR322::Tn5	in vivo insertion of Tn5	This laboratory
pSUP1011	pBR325 Tn5 mob	Simon et al. (1983)
pSUP5011	pBR325 Tn5 mob (mob inserted into Tn5)	Simon et al. (1983)
p112	p42d::Tn5	Noel et al. (1984)

Results

Isolation of mutant strains

In *K. pneumoniae* ntrC⁻ and ntrA⁻ mutants have low levels of GS activity (Espino et al. 1981, 1982; de Bruijn and Ausubel 1981; Merriek 1983). Since MS is a specific inhibitor of GS activity, we hypothesize that in *R. phaseoli* an MS-sensitive phenotype may be caused by a loss or decrease of GSI and/or GSII activities. Strains CE2 and CE3 (Noel et al. 1984) were mutagenized with transposon Tn5 or Tn5 mob (see Materials and methods). Km^r derivatives were screened for MS sensitivity on minimal medium plates containing 5 or 10 g/ml of the inhibitor. About 0.1% of the Km^r mutants were MS^r. This very high ratio may indicate a high number of genes involved in MS metabolism, or nonrandom Tn5 insertion. The latter is unlikely as the range of auxotrophs produced after Tn5 mutagenesis of *R. phaseoli* suggests that Tn5 insertion is random (Beringer et al. 1978; Noel et al. 1984). Two types of MS^r mutants were distinguished; one that completely failed to grow on 5 g/ml of the inhibitor (strains CFN2012, CFN2017) and another that was less sensitive (strains CFN2014, CFN2018, CFN2011, CFN2013 and CFN2026), see Table 2.

Table 2. Sensitivity to methionine sulfoximine and activities of GSI and GSII and nitrogenase of MS^r mutants

Class	Strain	Growth			Transverse activity		Nitrogenase %
		MM	MM + MS 5 µg/ml	MM + MS 10 µg/ml	GSI	GSII	
Wild type	CE2	+	+	+	1.40	6.30	100
I	CFN2014	+	±	±	0.60	0.30	ND ^a
	CFN2018	+	±	±	1.25	5.60	5-15
III	CFN2012	+	-	-	1.10	ND	100
	CFN2017	+	-	-	1.60	6.05	100
IV	CFN2011	+	-	-			

^a Not detected

Genetical characterization of mutants

Plasmid pJB3, a Km-sensitive derivative of R68.45 (Brewin et al. 1980), was used to mobilize the kanamycin resistance (Tn5) from the mutants to strains CE2 or CE3. Transconjugants appeared at a frequency of 10^{-6} or 10^{-4} per recipient, depending on whether the donor strain carried Tn5 or Tn5^{mob}, respectively, and were all MS^r, indicating that the MS^r mutations were caused by Tn5 insertion.

Physical localization of Tn5

Strain CFN42 harbors six plasmids (a-f, see Fig. 1): plasmid p42d has been shown to carry three copies of the *nifII* gene (Quinto et al. 1982). Strains cured of this plasmid lose their nodulation capacity and regain it upon reintroduction of p42d (Palacios et al. 1983; Leemans et al. 1984). p42d therefore is called the Sym plasmid. All MS^r CFN42 derivatives were found to have a plasmid pattern identical to that of CFN42 (data not shown). Hybridization of such plasmid patterns against ³²P-labeled pBR322::Tn5, located the Tn5 insertion in the chromosome in most of the mutants (CFN2011, CFN2021, CFN2012, CFN2017, CFN2014, CFN2018) and on plasmid p42e in strains CFN2013 and CFN2026 (Fig. 1). Similar hybridization of restriction patterns of *Eco*RI-digested total DNA showed that all mutants contain a single copy of Tn5 (data not shown).

Glutamine synthetase activities and symbiotic properties of MS^r mutants

The GSI and GSII transferase activities and the ability to nodulate and fix nitrogen on roots of *P. vulgaris* were determined for all mutants. Table 2 summarizes the results. We could distinguish four phenotypic classes: Class I mutants CFN2014 and CFN2018 have reduced levels of GSI and GSII activities. The symbiotic properties of these mutants also have been altered: they induce fewer nodules, which are white, small, and lack nitrogenase activity. Class II mutants CFN2013 and CFN2026 have wild-type levels of GSI and GSII activities, they do nodulate but their capacity to fix nitrogen has been significantly reduced (less than 20% of normal acetylene reduction). In these mutants, Tn5 is located on plasmid p42e. Similar results were observed with a MS^r Km^r transconjugant obtained by mobilizing Tn5 from strain CFN2013 to strain CE2 (data not shown), indicating that this phenotype is caused by the Tn5 insertion. Class III mutants CFN2012 and CFN2017 have no

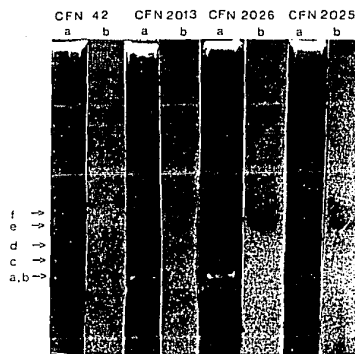


Fig. 1. Localization of Tn5 insertion on plasmid p42e in mutants CFN2013 and CFN2026. Plasmids from strains CFN42, CFN2013, CFN2026 and CFN2025 (a CFN2013 derivative cured of plasmid Sym) were separated on a 0.7% agarose gels according to the Eckhardt procedure (Eckhardt 1978), gels were stained with ethidium bromide (lanes a) blotted into nitrocellulose filters and hybridized with ³²P-labeled nitrocellulose filters and hybridized with ³²P-labeled pBR322::Tn5 (lanes b)

detectable GSII activity but retain wild-type GSI activity; nodulation and nitrogenase activities in these strains are similar to the wild type. Class IV mutant CFN2011 has wild-type GSI and GSII activities, nodulates and fixes nitrogen in a manner indistinguishable from the wild type.

Further characterization of class I mutants

The fact that class I mutants have reduced levels of GS activities and are unable to fix nitrogen suggests, that the mutation is in a gene the product of which is involved in regulation of both ammonia assimilation and symbiotic nitrogen fixation. To characterize these mutations further, we isolated a Km-resistant clone from a bank of CFN2018 DNA constructed in pBR328. The resulting hybrid plasmid pGE2 carries an 18 kb *Eco*RI fragment including the Tn5 insertion. pGE2 was used as a hybridization probe to isolate

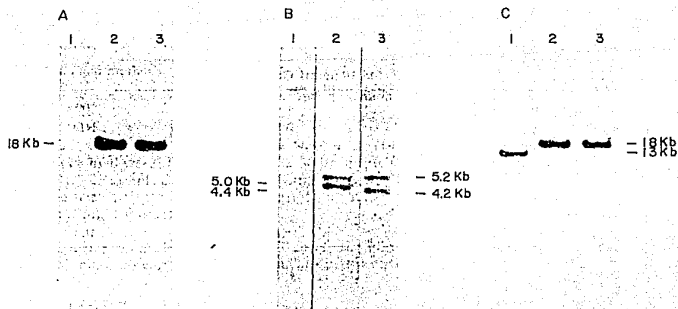


Fig. 2A-C. Hybridization of total DNA digests of strains CFN2014 and CFRN2018 with pSM7 and pBR322::Tn5 plasmids as probes. CFN42 (1), CFN2014 (2) and CFN2018 (3) total DNAs were digested with *EcoRI* A, C and *BamHI* B. Digests were separated on 0.8% agarose gels and transferred to nitrocellulose filters. Blots were hybridized with labeled ^{32}P -pBR322::Tn5 A, B and with ^{32}P -pSM7 C.

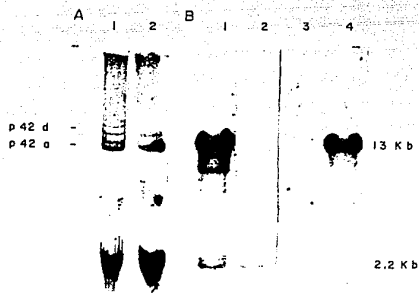


Fig. 3A, B. Hybridization of plasmids p42a and p42d with plasmid pSM7. Plasmids from strains CFN42, were separated on 0.7% agarose gels according to Hirsch et al. (1980), stained with ethidium bromide A-1, transferred to a nitrocellulose filter and hybridized with ^{32}P -labeled pSM7 A-2. *EcoRI* digests of total DNA of strains CFN42 B-1, C58C1p112 B-2, C58C1 B-3, and CFN2001 B-4 were separated on 0.8% agarose gels, blotted onto nitrocellulose filter and hybridized with ^{32}P -labeled pSM7 plasmids.

the wild-type sequence from a genome library of *R. phaseoli* CFN42 DNA constructed in phage 1059 (Calva et al. unpublished). This sequence was cloned into pBR329. The resulting plasmid pSM7 contains a 13 kb *EcoRI* insert. This plasmid hybridizes both in CFN2014 and CFN2018 with the 18 kb *EcoRI* fragment carrying Tn5 (Fig. 2), indicating the in the two strains the mutation is located in the same *EcoRI* fragment. Furthermore, hybridization of a *BamHI* restriction pattern of these mutants with pBR322::Tn5 (Fig. 2B) also indicates that Tn5 is located in the same *BamHI* fragment, and that the insertion sites are approximately 0.2 or 0.8 kb apart.

Plasmid pSM7 hybridizes with plasmids p42a and p42d

When an *EcoRI* digest of CFN42 was hybridized with pSM7 and autoradiography was carried out for 5 days instead of 18 h, we found that in addition to the 13 kb chromosomal band, three other bands hybridized with pSM7 (Fig. 3B1). These three hybridizing fragments are derived from plasmids p42a and p42d, as shown by hybridization of pSM7 to a plasmid pattern of CFN42 and to an *EcoRI* digest of a CFN42 derivative cured of plasmids p42a and p42d (Fig. 3A, B4). Hybridization of pSM7 and with p42a and p42d is not due to vector hybridization as in an control experiment pBR329 did not hybridize to an *EcoRI* restriction pattern of CFN42 (data not shown). We then determined which of the *EcoRI* fragments derived from p42d. An *EcoRI* digest of *Agrobacterium* C58C1 containing p112 (a p42d derivative carrying a Tn5 insertion Noel et al. 1984) was hybridized with pSM7. Homology with p42d is present in a 2.2 kb *EcoRI* fragment (Fig. 3B2).

Discussion

We isolated Tn5 insertions in *R. phaseoli* CFN42, which cause a MS⁻ phenotype, to investigate whether both ammonia assimilation and nitrogen fixation are controlled via a common regulatory mechanism. We distinguished four phenotypical classes of MS⁻ mutants. In two of these, glutamine synthesis has been altered. Class III mutants, have lost GSII transferase activity, but remain Fix⁺. Their phenotype suggests that they could have insertions in the *glnA* GSII structural gene or in a regulatory gene, the product of which is required for GSII activity but not for nitrogen fixation. These results agree with previously reported *Rhizobium* spp mutants in which loss of GSII activity does not result in a Fix⁻ phenotype (Ludwig 1980).

Class I mutants have low levels of GS1 and GSII activities and in addition are unable to fix nitrogen. Nodules produced by these mutants are smaller and white, similar to the nodules produced by *R. meliloti* mutants in the *nifA*-

like regulatory gene (Zimmerman et al. 1983). This suggests that the mutations are in a gene involved in regulation of both ammonia assimilation and nitrogen fixation. The chromosomal region carrying these mutations shows homology with plasmids p42a and p42d. The homologous sequences on p42a are not involved in symbiosis, as a CFN42 derivative cured of p42a nodules fixes nitrogen in a manner indistinguishable from the wild-type strain (Leemans et al. 1984). The *EcoRI* chromosomal fragment cloned into pSM7 is 13 kb long, thus it is quite possible that the homology we detected in p42d is not due to the gene mutated in CFN2014 and CFN2018 but to adjacent sequences. Cloning and site directed mutagenesis of the corresponding p42d sequence will allow an investigation of whether it is involved in symbiosis. In *K. pneumoniae* mutations in *ntrA* or in *ntrC* genes alter both GS and nitrogenase expression (Merrick 1983; Espin et al. 1981; de Bruijn and Ausubel 1981). Our class I mutants have a phenotype similar to *ntrA*⁻ or *ntrC*⁻ *K. pneumoniae* mutants. By Southern analysis using the *K. pneumoniae ntrC* gene as a probe (pMM12, Espin et al. 1982) we detected two regions of homology in CFN42, one of which is present on p42d (unpublished results). However, these regions do not correspond to the sequences carrying the mutation in strains CFN2014 and CFN2018, nor to its homologous sequence on p42d, indicating that the gene mutated in class I mutants is not structurally homologous to *ntrC*. Experiments conducive to the expression of this *R. phaseoli* regulatory gene in *K. pneumoniae* will allow us to investigate whether it is functionally related to the *ntrA* or the *ntrC* regulatory genes.

Class II mutants CFN2013 and CFN2026 carry mutations on plasmid p42e which impair nitrogen fixation. Symbiotic mutants of CFN42 isolated by random Tn5 mutagenesis were found to be located in the chromosome or in the symbiotic plasmid p42d (Noel et al. 1984). Yet another plasmid, p42c, is involved in symbiosis, since a CFN42 derivative cured of this plasmid shows reduced nodulation and nitrogen fixation (J. Leemans, personal communication). Taken together these data show that genes involved in symbiosis are located in four different replicons in CFN42: in the chromosome and in plasmids p42c, p42d and p42e. In CFN2013 and CFN2026 the activities of GSI or GSII are not altered. At present the nature of these mutations is unclear, we do not know whether they are involved specifically in symbiosis or whether the mutations are in genes exerting a pleiotropic effect on nitrogen fixation.

Class IV MS⁺ mutants do not affect glutamine synthesis or nitrogen fixation. Therefore the MS⁺ phenotype of these mutants might result from an increased uptake or from inability or reduced capacity to degrade the inhibitor.

The experiments presented do not rule out the role of GSI and/or GSII themselves in the regulation of *nif* genes in *R. phaseoli*. As the method used did not produce mutations in the structural gene for GSI, and although it did produce mutants that have lost GSI activity, we have not demonstrated that they contain insertions in the structural gene for GSII. What we have shown with class I mutants is that there are genes in *R. phaseoli* that are involved in both ammonia assimilation and nitrogen fixation; whether these genes are analogous to the *ntr* genes described in *K. pneumoniae* remains an open question.

for technical help, and C. Hernández for typing the manuscript. We are also indebted to E. Calva and M. Girard for provision of their phage library.

References

- Bender RA, Janssen KA, Resnick AD, Blummenberg M, Foor F, Magasanik B (1977) Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 129: 1001-1009
- Beringer JE, Beynon JL, Buchanan-Wollaston AV, Johnston AWB (1978) Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature* (London) 276: 633-634
- Beynon J, Cannon M, Buchanan-Wollaston V, Cannon F (1983) The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell* 34: 665-675
- Boyer HB, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA. *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41: 459-472
- Brewin NJ, Beringer JE, Johnston AWB (1980) Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 120: 413-420
- de Bruijn FJ, Ausubel FM (1981) The cloning and transposon Tn5 mutagenesis of the *glnA* region of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of *glnR*, a gene involved in the regulation of the *nif* and *hut* operons. *Mol Gen Genet* 183: 289-297
- de Bruijn FJ, Ausubel FM (1983) The cloning and characterization of the *glnR* (*ntrA*) gene of *Klebsiella pneumoniae*: Role of *glnR* (*ntrA*) in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilation genes. *Mol Gen Genet* 192: 342-353
- Buchanan-Wollaston V, Cannon MC, Beynon JL, Cannon FC (1981a) Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* 294: 776-778
- Buchanan-Wollaston V, Cannon MC, Beynon JL, Cannon FC (1981b) Use of cloned *nif* (nitrogen fixation) DNA to investigate transcriptional regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Gen Genet* 184: 102-106
- Covarrubias L, Bolivar F (1982) Construction and characterization of new cloning vehicles VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base pair inverted duplication. *Gene* 17: 79-89
- Darrow RA, Knotts RR (1977) Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 78: 554-559
- Dixon R, Eady RR, Espin G, Hill S, Iacurino M, Kahn D, Merrick M (1980) Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. *Nature* 286: 128-132
- Dixon R, Alvarez-Morales A, Clements J, Drummond M, Merrick M, Postgate JR (1984) Transcriptional control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. In: Veeger C, Newton FE (eds) Advances in nitrogen fixation research. Nijhoff/Junk Pudoc, Wageningen, p 635-642
- Drummond M, Clements J, Merrick M, Dixon R (1983) Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* 301: 302-307
- Eekhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588
- Espin G, Alvarez-Morales A, Merrick M (1981) Complementation analysis of *glnA*-linked mutations which affect nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Gen Genet* 184: 213-217
- Espin G, Alvarez-Morales A, Cannon F, Dixon R, Merrick M (1982) Cloning of the *glnA*, *ntrB*, and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. *Mol Gen Genet* 186: 514-524
- Hill S, Kennedy C, Kavanagh E, Goldberg RB, Hanau R (1981) Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* 290: 424-426
- Hirsch PR, Van Montagu M, Johnston AWB, Brewin NJ, Schell J (1980) Physical identification of bacterioecoenicogenic nodulation

Acknowledgements. We thank J. Leemans and L. Segovia for assistance in preparing the manuscript, Y. Peralta and H. de la Vega

- and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol 120:403-412
- Holsters M, Silva B, Van Vliet F, Genetello C, De Block M, Dhaze P, De Piecher A, Inze D, Engler G, Villaroel R, Van Montagu M, Schell J (1980) The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTi C58. Plasmid 3:212-230
- Kennedy C, Cannon F, Cannon M, Dixon R, Hill S, Jennsen J, Kumar S, MacLean P, Merrick M, Robson R, Postgate J (1981) Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. In: Gibson AH, Newton WE (eds) Current perspectives in nitrogen fixation. Australian Academy of Sciences, Canberra, pp 146-156
- Kondorosi A, Svab Z, Kiss GB, Dixon RA (1977) Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. Mol Gen Genet 151:221-226
- Leemans J, Soberon G, Cevallos MA, Fernandez L, Pardo MA, de la Vega H, Flores M, Quinto C, Palacios R (1984) General organization of *Rhizobium phaseoli* nif plasmids. In: Veeger C, Newton WE (eds) Advances in nitrogen fixation research. Nijhoff/Junk Pudo, Wageningen, p 710
- Ludwig R (1980) Regulation of *Rhizobium* nitrogen fixation by the unadenylated glutamine synthetase I system. Proc Natl Acad Sci USA 77:5817-5821
- Ludwig RA, Singer ER (1977) Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in *Rhizobium*. Nature (London) 267:245-248
- Merrick M (1983) Nitrogen control of the nif regulation in *Klebsiella pneumoniae*: Involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. EMBO J 2:39-44
- Merrick M, Hill S, Henneke H, Hahn M, Dixon R, Kennedy C (1982) Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. Mol Gen Genet 185:75-81
- Noel KD, Sanchez A, Fernandez L, Leemans J, Cevallos MA (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J Bacteriol 158:148-155
- Ow DW, Ausubel FM (1983) Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. Nature 301:307-313
- Palacios R, Quinto C, de la Vega H, Flores M, Fernandez L, Hernandez M, Ballado T, Soberon G (1983) General organization of nitrogen fixation genes in *Rhizobium phaseoli*. In: Püßler A (ed) Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 164-168
- Quinto C, de la Vega H, Flores M, Fernandez L, Ballado T, Soberon G, Palacios R (1982) Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature 299:724-726
- Robertis GP, Brill WJ (1981) Genetics and regulation of nitrogen fixation. Annu Rev Microbiol 35:207-235
- Simon R, Prieser U, Püßler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Biotechnol 1:784-791
- Soberon X, Coharrubias L, Bolivar F (1980) Construction and characterization of new cloning vehicles IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR327. Gen 9:287-305
- Sommerville JE, Kahn ML (1983) Cloning of the glutamine synthetase I gene from *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol 156:168-176
- Szeto WW, Zimmerman JL, Sundaresan V, Ausubel FM (1984) A *Rhizobium meliloti* symbiotic regulatory gene. Cell 36:1035-1043
- Verma DPS, Long S (1983) The molecular biology of *Rhizobium-legume* symbiosis. In: Jeon K (ed) International review of cytology, suppl 14. Academy Press, New York, p 211-245
- Waeck T, Brill WJ (1976) Simple, rapid assay for screening nitrogen fixing ability in soy-bean. Crop Sci 16:519-522
- Zimmerman JL, Szeto WW, Ausubel FM (1983) Molecular characterization of Tn5-induced symbiotic Fix⁻ mutants of *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol 156:1025-1036

Communicated by J. Schell

Received February 26, 1985

Discusión

Con el objeto de estudiar la regulación genética de las glutamino sintetasas I y II y su relación con la fijación simbiótica de nitrógeno, este proyecto se inició aislando mutantes de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* con alteraciones en la síntesis de glutamina. Como se describe en el artículo, este objetivo se logró, ya que en dos clases de las cuatro que distinguimos con fenotipo MS^s la síntesis de glutamina está alterada. La caracterización posterior de las mutantes de la clase III, reportadas en el artículo nos permitió clonar los genes *ntrB* y *ntrC* ya que encontramos que la cepa CFN2012 contiene una mutación *ntrC*::Tn5 y la cepa CFN2017 contiene una mutación *ntrB*::Tn5, por lo que concluimos que en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, la síntesis de la GSII y no la síntesis de la GSI ni de la nitrogenasa están bajo el control del sistema regulatorio *ntr*. Sabemos además que en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* los genes *ntrB* y *ntrC* no están ligados a los genes *glnA* ó *glnII* y que están organizados en un operón *pntrBC* (Moreno et al 1992). Por otro lado aunque la síntesis de la GSI no está bajo el control del sistema *ntr*, tenemos evidencia que la regulación de su actividad sí está, ya que la mutante CFN2012 contiene 3 veces menos proteína P_{II} (el producto del gene *glnB*) (Moreno et al 1992) y tiene niveles bajos de adenilación (Noguez 1992). Al igual que en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, la fijación simbiótica de nitrógeno en otras especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, no es regulada por el sistema *ntr*, ya que el gene regulador *nifA*, es activado por los productos de los genes reguladores *FixLJ* cuya síntesis es regulada por la concentración de oxígeno (de Bruijn et al 1990).

Posteriormente en mi laboratorio hemos clonado los genes estructurales

de la GSI (*glnA*) y la GSII (*glnII*) (Espín et al 1988, 1991). Hemos también demostrado que además de estos genes *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* posee un tercer gene *glnT* que codifica para la GSIII que posee características distintas a las GSs reportadas (Espín et al 1988, 1990, Chuirazzi et al 1992).

Hemos construido una colección de cepas con mutaciones en cada uno de los genes estructurales de las tres glutamino sintetetasas.

glnA y su producto la GSI.

El gene *glnA*, se clonó por complementación de cepas *glnA*- de *K. pneumoniae* con un banco de genes de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*. Este gene se expresa en *K. pneumoniae* a partir de su propio promotor, la GSI expresada en *K. pneumoniae* se adenila en respuesta a los niveles de amonio del medio de manera similar a la GS de *K. pneumoniae*. En la cepa silvestre CE3 de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* la actividad de GSI que se detecta en amonio limitante es similar a la que se encuentra en exceso de amonio, y la actividad de GSI no se afecta en las mutante CFN2012 (que contiene la mutación *nrC::Tn5*). El grado de adenilación de esta enzima es de alrededor del 50% en exceso o limitación de amonio. Estos datos sugieren que ni la síntesis ni la actividad de la GSI son reguladas de manera significativa por la fuente de nitrógeno. A través de la técnica de mutagenesis sitio-dirigida construimos la cepa SM58 de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* que contiene la mutación *glnA::Km*. Como era de esperarse esta cepa carece de la actividad de la GSI. El crecimiento de esta cepa en medio con amonio limitante es similar al de la cepa silvestre, y en medio con exceso de amonio la cepa SM58 tiene un tiempo

de duplicación (160 min) ligeramente mayor que el de la cepa silvestre (140 min).

Con respecto al papel de la GSI en la fijación de nitrógeno, hemos encontrado que GSI es la única actividad de GS presente en bacteroides fijadores de nitrógeno aislados de nódulos inducidos por la cepa silvestre, y no se detecta ninguna actividad de GS en bacteroides aislados de nódulos inducidos por la cepa SM58. Aunque la cepa SM58 tiene la capacidad de inducir la formación de nódulos en plantas de frijol de manera similar a la cepa silvestre, la capacidad de fijación de nitrógeno medida en los nódulos inducidos por ésta cepa esta reducida cerca de un 50% con respecto a la cepa silvestre. Un estudio histológico de la ultraestructura de los nódulos nos mostró que las células infectadas por la cepa SM58 contienen menos bacteroides que las células infectadas por la cepa silvestre, y que los bacteroides de la cepa SM58 contienen gran cantidad de granulos de polihidroxibutirato. Estos datos nos indican que aunque no es indispensable, la síntesis de glutamina contribuye para el establecimiento de una simbiosis efectiva. La síntesis de glutamina podría ser importante en varios estados durante el establecimiento de la simbiosis antes de la fijación de nitrógeno, como por ejemplo para la proliferación y diferenciación de los bacteroides, La reducción en la fijación de nitrógeno de los nódulos inducidos por la mutante GSI- podría deberse a la reducción en el número de bacteroides. Aunque generalmente se asume que los bacteroides fijadores de nitrógeno no asimilan amonio, es probable que se lleve a cabo alguna síntesis de glutamina, ya que ésta es utilizada como precursor de la síntesis de coenzimas que son esenciales para la actividad de la nitrogenasa.

Regulación de la glutamino sintetasa II

El gene *glnII* de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, se identificó por hibridación de un banco de genes de la cepa silvestre CE3 con el gene *glnII* de *B. japonicum*. La expresión de este gene en *E. coli* depende de la presencia de los genes del sistema *ntr*. En *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* la síntesis de la GSII es regulada por la fuente de nitrógeno, ya que se encuentran altos niveles de actividad en amonio limitante y niveles muy bajos en exceso de amonio. Además las mutantes CFN2012 (*ntrC::Tn5*) y CFN2017 (*ntrB::Tn5*) carecen de la actividad de GSII. Estos datos indican que la expresión del gene *glnII* está bajo el control del sistema *ntr*. Con el objeto de determinar el papel de la GSII en la asimilación de amonio en vida libre y en simbiosis, construimos la cepa SM88 que lleva la mutación *glnII::Sp*. El crecimiento de esta cepa en amonio limitante es ligeramente menor que el de la cepa silvestre.

Con respecto al papel de la GSII en la simbiosis, sabíamos ya que esta actividad no se encuentra en bacteroides fijadores de nitrógeno, y que las mutantes *NtrC-* y *NtrB-* nodulan y fijan nitrógeno como la cepa silvestre. Estos datos sugerían que la GSII no tiene ningún papel en la simbiosis, sin embargo datos preliminares indican que la cepa SM88 que carece de la actividad de GSII debido a una mutación en el gene estructural, tiene reducida de manera significativa su capacidad para nodular. Este resultado inesperado sugiere que la GSII es importante al inicio del proceso simbiótico. El hecho de que en la cepa *NtrC-* (que carece de la actividad de GSII en vida libre) no se observa este fenotipo nos indica que si se induce la síntesis de la GSII durante la simbiosis, esta inducción no parece depender del sistema *ntr*.

Aún cuando construcción de las cepas SM58, y SM88 por recombinación de

los genes mutados fue relativamente fácil, en repetidos intentos tratamos de construir una doble mutante GS1-GSII-, sin embargo no tuvimos éxito. Esto sugiere que una doble mutante *glnA-glnII-* de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* es letal. Esto podría deberse a que no transporta suficiente glutamina para crecer. Sería interesante determinar si *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* es capaz de transportar glutamina al interior de la célula.

El gene *glnT* y su producto la GSIII.

El gene *glnT* se identificó por hibridación con el locus *glnT* de *R. meliloti*, y por complementación de cepas *glnA-* de *K. pneumoniae* y *E. coli*. El papel de la GSIII en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* es a la fecha un enigma, ya que no hemos encontrado las condiciones fisiológicas donde esta enzima se sintetiza. por lo que la posibilidad de que *glnT* es un gene críptico no se ha descartado. Algunos datos sin embargo nos permiten especular sobre el papel de esta enzima. El análisis de la secuencia de DNA que contiene al gene *glnT*, nos reveló la presencia de un marco abierto de lectura abajo del gene *glnT*, este ORF comparte homología con los genes de la vía de biosíntesis de purinas *purBC* de *Bacillus subtilis*. Estos datos sugieren que *glnT* pudiera formar parte de un operón de la biosíntesis de purinas. La GSIII podría sintetizar glutamina específicamente para la biosíntesis de purinas.

Recientemente construimos una cepa con la mutación *glnT::Sp*. La caracterización de esta cepa sin duda contribuirá a esclarecer el papel de la GSIII en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*.

Significado de múltiples GSs en *Rhizobium*.

En resumen los resultados presentados nos revelan la presencia de tres genes de GS en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, El significado de múltiples isoformas de GS en *Rhizobium* que son bacterias expuestas a tan diversas condiciones fisiológicas como lo son el suelo, y las células de la planta no está aún claro, sin embargo con base en los resultados obtenidos me gustaría proponer que en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, la GSI es una enzima con función "housekeeping", ya que esta presente en niveles bajos constitutivos en todas las condiciones analizadas, tanto en vida libre como en bacteroides, que la GSII funciona preferentemente en condiciones de limitación de nitrógeno en vida libre o de microaerofilia, como podrían ser en el hilo de infección en el inicio de la nodulación. La GSIII como ya lo mencioné podría funcionar para proveer glutamina para la síntesis de purinas o en algún paso durante el proceso simbiótico.

Con respecto al papel de las GSs en otras especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en la simbiosis, como ya lo mencione en la introducción la nodulación y la fijación de nitrógeno en cepas *glnA-* y *glnII-* de *R. meliloti* y *B. japonicum* parecen ser normales lo que sugiere que ni la GSI ni la GSII son esenciales, sin embargo la síntesis de glutamina parece ser importante durante este proceso ya que en *B. japonicum* una doble mutante *glnA-glnII-* es un auxotrofo de glutamina y es Nod- (Carlson et al 1987) mientras que en *R. meliloti*, una doble mutante no es auxotrofo de glutamina en ciertas condiciones y tiene un fenotipo Nod+Fix+(Somerville et al 1989). La síntesis de glutamina por las diferentes GSs parecería aún más importante en *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, ya que a diferencia de *R. meliloti* y *B. japonicum*, mutaciones en *glnA*, y *glnII* disminuyen sus capacidades simbióticas. Esta diferencia podría estar dada por la

incapacidad de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, de tomar glutamina del medio (si fuera el caso). No debemos olvidar que la infección puede ser iniciada por unas cuantas bacterias que se multiplican dentro de la planta, primero en el hilo de infección y después dentro de las células infectadas, y que los nutrientes para esta proliferación debe proveerlos la planta.

Referencias

- Adams, T. H. and Chelm, B. K. (1988) Effects of oxygen levels on the transcription of *nif* and *gln* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol. 134: 611-618.
- Albright, L. M., Huala, E., and Ausubel, F. M. (1989) Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator proteins pairs. Annu. Rev. Genet. 23: 311-336.
- Appleby, C.A. (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 443-478.
- Bergersen, F. J. and Turner, G.L. (1967) Nitrogen fixation by bacteroids fraction of soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta 141: 507-515.
- Bravo, A. and Mora, J. (1988) Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. J. Bacteriol. 170: 980-984.
- Brewin, N. J. (1991) Development of the legume root nodule. Ann. Rev. Cell Biol. 7: 191-226.
- Brown, C. M. and Dilworth, M. J. (1975) Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol. 86: 39-48.
- Carroll, B. J., McNeal, D. L., and Gresshoff, P. (1985) Isolation and properties of (*Glycine max* (L.) Merr.) mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4162- 4166.
- Carlson, T. A. and Chelm, B. K. (1986) Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from *Bradyrhizobium japonicum*. Nature 322: 568-570.
- Carlson, T. A. , Martin, G. B. and Chelm B. K. (1987) Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium*

japonicum. J. Bacteriol. 169: 5861-5866.

Carlson, T. A., Guerinot, M. L. and Chelm B. K. (1985) Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (*glnA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 162: 698-703.

Collona-Romano, S., Riccio, A., Guida, M., Defez, R. Lamberti, A., Iaccarino, M. Arnold, W. Priefer, U., and Puhler, A. (1987) Tight linkage of a putative regulatory gene in *Rhizobium leguminosarum*. Nucleic Acids Res. 15: 1951-1964.

Chirazzi, M. and Iaccarino, M. (1990) Transcriptional analysis of the *glnB-glnA* region of *Rhizobium leguminosarum*. Mol Microbiol. 4: 1727-1735.

Darrow, R.A. (1980) Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. In Glutamine Synthetase: Metabolism, Enzymology and Regulation. J. Mora, R. Palacios eds. Academic Press, Inc. New York pp. 139-166.

Darrow, R.A. and Kotts, R.R. (1977) Two forms of glutamine synthetase in free-living and root nodule bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 554-559.

de Bruijn, F. J., Rossbach, S., Schneider, M. Ratet, P., Messmer, S. Szeto, W. Ausubel, F., and Schell, J. (1989) *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. 171: 1673-1682.

de Bruijn, F., Hilgert, U., Stigter, J., Schneider, M., Meyer, H., Klosse, U., and Pawloski, K. (1990) Regulation of nitrogen fixation and assimilation genes in the free-living versus symbiotic state. In: Nitrogen fixation: Achievements and Objectives. P. Gresshoff, R. Evans, G. Stacey, W. Newton. Chapman and Hall, New York and London pp 33-44.

Dixon, R., Eady, R., Espín, G., Hill, S., Iaccarino, M., Kahn, D., and Merrick, M. (1980) Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. Nature 286: 128-132.

- Dixon, R., Alvarez-Morales, A., Clements, J., Drummond, M., Merrick, M., and Postgate, J. R. (1984). Transcriptional control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. In: Veeger C., Newton WE. eds. Advances in nitrogen fixation research. Nijhoff/Junk Pudoc, Wageningen, pp 653-642.
- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., de Bruijn, F., and Schell, J. (1989) The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nod ABC*) are nitrogen regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the present of ammonium. Mol. Gen. Genet. 219: 89-96.
- Espín, G., Alvarez-Morales, A., and Merrick, M., (1981) Complementation analysis of *glnA*-linked mutations which affect nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Gen. Genet. 184: 213-217.
- Espín, G., Alvarez-Morales, A., Cannon, F., Dixon, R., and Merrick, M. (1982) Cloning of the *glnA*, *ntrB*, and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies on their role in regulation of nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. Mol. Gen. Genet. 186: 514-524.
- Espín, G. (1984) Regulación nitrogenada de la fijación de nitrógeno en *Klebsiella pneumoniae*. En Caminos de la Biología Fundamental. eds Soberón G., Martuscelli J., Palacios R. UNAM pp 199-206.
- Espín, G., Moreno, S., Wild, M., Meza, R. (1988) *Rhizobium phaseoli* glutamine synthetases. In: Nitrogen fixation: Hundred years after. H. Bothe, F. de Bruijn, W.E. Newton eds. Gustav Fisher, New York pp 517
- Espín, G., Moreno, S., Wild, M., Meza, R., and Iaccarino M. (1990) A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. Mol. Gen. Genet. 223: 513-516.
- Filser, M., Moscatelli, C., Lamberti, A., Vincze, E., Guida, M., Salzano, G., and Iaccarino, M., (1986) Characterization and cloning of two *Rhizobium leguminosarum* genes coding for glutamine synthetase activities. J. Gen. Microbiol. 132: 2561-2569.
- Fuchs, R. I. and Keister, D. L. (1980) Comparative properties of glutamine synthetase I and II in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. J.

Bacteriol. 141: 996-998.

Ginsburg, A. and Stadman, E. R. (1973) in Prusiner and Stadman E. Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Prusiner, S., Stadman, E. eds, The Enzymes of Glutamine Metabolism. Academic Press Inc. New York. pp 9-44.

Holtel, A., Collona-Romano, S., Guida, M., Riccio, A., Merrick, M., and Iaccarino M. (1989) The *glnB* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. FEMS Lett. 58: 203-207.

Howitt, S. M. and Greshoff, P. (1985) Ammonia regulation of glutamine synthetase in *Rhizobium* sp ANU298. J. Gen. Microbiol. 98: 477-484.

Keener, J. and Kustu, S. (1988) Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved N-terminal domain of NTRC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4976-4980.

Kennedy, C., Cannon, F., Cannon, M., Dixon, R., Hill, S., Jennsen, J., Kumar, S., MacClean, P., Merrick, M., Robson, R., and Postgate, J.R. (1981) Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. In: Gibson A.H. Newton NE eds Current perspectives in nitrogen fixation. Australian Academy of Sciences, Canberra, pp 146-156.

Kondorosi, A., Svab, Z, Kiss, G., and Dixon, R. (1977) Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 151: 221-226.

Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D., and Weiss, D. (1989) Expression of sigma-54 (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. Microbiol. Rev. 53: 367-376.

Layzell, D. B., Hunt, A., Moloney, S., Fernando, S. M., and Diaz del Castillo L. (1990) Physiological, metabolic and developmental implications of O₂ regulation in legume nodules. In Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. P. Gresshoff, L. Roth, G. Stacey, and W. E. Newton eds. Chapman and Hall, New York, pp. 21-32.

Ludwig, R., and Signer, E. (1977) Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in *Rhizobium*. *Nature* 267: 245-248.

Ludwig, R. (1980) Physiological roles of glutamine synthetase I and II in ammonium assimilation in *Rhizobium* sp. 32H1. *J. Bacteriol.* 141: 1209-1216.

Magasanik, B. (1982) Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 16: 135-168.

Mantzala, M., and Zalkin, H. (1976) Properties of apoglutamate synthase and comparison with glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 251: 3300-3305.

Martin, G. B., Chapman, K.A., and Chelm, B.K. (1988) Role of *Bradyrhizobium japonicum* *ntnC* gene product in differential regulation of glutamine synthetase II gene (*glnII*). *J. Bacteriol.* 170: 5452-5459.

Martin, G. B., Tomashow, M. F., and Chelm, B.K. (1989) *Bradyrhizobium japonicum* *glnB*, a putative nitrogen-regulatory gene, is regulated by NtrC at tandem promoters. *J. Bacteriol.* 171: 5638-5645.

Meister, A. (1980) Catalytic mechanism of glutamine synthetase; Overview of glutamine metabolism. In: *Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation*. J. Mora and R. Palacios eds. Academic Press New York pp. 1-40.

Mellor, R. B. (1989) Bacteroids in the *Rhizobium*-Legume symbiosis inhabit a plant litic compartment: implications for other microbial endosymbiosis. *J. Exp. Botany*, 40: 831-839.

Minchin, F. R., Witty, J. F., and Skot, L. (1987) In: *Physiological Limitations and Genetic Improvement of Symbiotic Nitrogen Fixation*. F. O'Gara, S. Manian, J. J. Drevon, eds. Kluwer Academic Dordrecht. pp. 77-85.

McDermott, T.R., Griffith, S. M., Vance, C.P., and Graham, P.H. (1989) Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 327-340.

Morett, E., Moreno, S., and Espín, G. (1985) Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximine sensitive (MS^s) mutants of *Rhizobium phaseoli*. Mol. Gen. Genet. 200: 229-234.

Moreno, S., Meza, R., Guzman, J., Caravez, A., and Espín, G. (1991) The *glnA* gene of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* and its role in symbiosis. Mol. Plant-Microbe Interactions, 4: 619-622.

Moreno, S.; Patriarca, E., Chiurazzi, M., Meza, R., Defez, R., Lamberti, A., Riccio, A., Iaccarino, M., and Espín, G. (1992) Phenotype of a *Rhizobium leguminosarum ntrC* mutant. Res. Microbiol, 143: 161-171.

Nixon, B. T., Ronson, C. W., and Ausubel, F. (1986) Two component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7850-7854.

Noel, K. D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J., and Cevallos, M.A. (1984) *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158: 148-155.

Noguez, R. (1992) Regulacion de la actividad de la glutamino sintetasa I de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* por adenilacion. Tesis licenciatura en Biologia Universidad Autonoma de Morelos.

O'Gara, F. and Shanmugam, K. T. (1976) Regulation of nitrogen fixation by *Rhizobium*: Export of fixed N₂ as NH₄⁺. Biochim. Biophys. Acta. 473: 313-321.

Pate, J. S. (1980) Transport and partitioning of nitrogenous solutes. Annu. Rev. Plant Physiol. 31: 313-328.

Popham, D., Szeto, D., Keener, J. and Kustu, S. (1989). Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. Science 243: 629-635.

Rao, V., Ranga, R., Darrow, R., and Keister, D. L. (1978) Effect of oxygen tension on nitrogenase and on glutamine synthetase I and II in *Rhizobium japonicum*. Biochim. Biophys Res. Comm. 81: 224-231.

Reitzer, L. J. and Magasanik, B. (1985) Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated in tandem promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 1979-1983.

Reitzer, L. J. and Magasanik, B. (1987) Ammonia assimilation and biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. F.C. Neidhart, ed. A.S.M., Washington, pp302-320.

Rhee, S. G., Chock, P. B. and Stadman, E.R. (1985) Glutamine synthetase from *Escherichia coli*. Meth. Enzymol. 113: 213-241.

Ronson, C. W., Nixon, T. B., Albright, L. M., and Ausubel, F. (1987) *Rhizobium meliloti ntrA (rpoN)* gene is required for diverse metabolic functions. J. Bacteriol. 169: 2424-2431.

Rossi, M., Defez, R. Chiurazzi, M. Lamberti, A., Fuggi, A., and Iaccarino, M. (1989) Regulation of glutamine synthetase isoenzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. J. Gen. Microbiol. 135: 629-637.

Shatters, R. G., Somerville, J. E., and Kahn, M. L. (1989) Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. J. Bacteriol. 171: 5087-5094.

Somerville, J. E., and Kahn, M. L. (1983) Cloning of the glutamine synthetase I gene from *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 156: 168-176.

Somerville, J. E. Shatters, R. G., and Kahn, M. (1989) Isolation, characterization and complementation of *Rhizobium meliloti* 104A14 mutants that lack glutamine synthetase II activity. J. Bacteriol. 171: 5079-5086.

Stadman, E. R., Mura, E., Chock, P. B. and Rhee, S.G. (1980) The interconvertible enzyme cascade that regulates glutamine synthetase

activity. In: Glutamine: Metabolism, Enzymology and Regulation eds J. Mora, R. Palacios. Academic Press. New York pp 41-59.

Stadman, E. R. (1990) Discovery of glutamine synthetase cascade. Meth. Enzymol. 182: 793-808.

Streeter, J. (1988) Inhibition of legume nodule formation and nitrogen fixation by nitrate. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 7: 1-24.

Szeto, W., Zimmerman, J., Sundaresan, V., and Ausubel, F. (1984) A *Rhizobium meliloti* symbiotic regulatory gene. Cell 36: 1035-1043.

Szeto, W. W., Nixon, T., Ronson, C., and Ausubel, F. (1987) Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for an activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. J. Bacteriol. 169: 1423-1432.

Thony, B., and Hennecke, H. (1989) The -24/-12 ppromoter comes to age. FEMS Microbiol. Rev. 63: 341-358.

Vance, C. P. and Heichel, G. H. (1991) Carbon in N₂ fixation. Annu. Rev. Plant Physiol. 42: 373- 392.

Wang, S. P. and Stacey, G. (1990) Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet. 223: 329-331.

Weiss, V. and Magasanik, B. (1988) Phosphorylation of nitrogen regulator I (NR₁) of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8919-8923.

Witty, J. F., Minchin, F. R., Skot. L., and Sheehy, J. (1986) Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodule. In: Oxford Surveys of plant molecular and cell biology. 3: 275-314.

Wedel, A., Weiss, D., Popham, D., Droge, P., and Kustu, S. (1990) A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. Science 248: 486-490.

Wen Su, Porter, S., Kustu, S., and Echols, H., (1990) DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5504-5508.