

00562



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

**Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli ¿ UNA
BACTERIA SIMBIÓTICA O PATÓGENA ? UNA
MUTACION EN glnT HACE LA DIFERENCIA.**

Tesis que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Químicas

(Bioquímica)

presenta :

Josefina Guzmán Aparicio

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

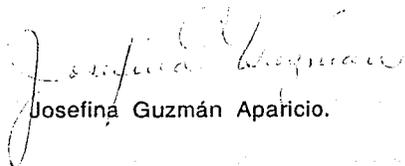
Rhizobium leguminosarum biovar *phaseoli* ¿Una bacteria simbiótica o patógena?. Una mutación en *glnT* hace la diferencia. (1993) Guzmán Aparicio, J.

Las bacterias del género *Rhizobium* forman interacciones simbióticas con plantas leguminosas. Esto resulta en la formación de estructuras especializadas, llamados nódulos, en los cuales la bacteria se diferencia en bacteroides y fijan nitrógeno. El amonio producido por los bacteroides es exportado a las células de la planta donde es asimilado. La planta supe de fuente de carbono a la bacteria para satisfacer las demandas de alta energía de la fijación de nitrógeno. Otra característica de las especies de *Rhizobium* es que tienen dos isoenzimas de glutamino sintetetasas: GSI, parecida a las glutamino sintetetasas de enterobacterias, y GSII, similar a las GSs de eucariotes. En *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* se ha demostrado la presencia del gene *glnT* que codifica para una tercera glutamino sintetasa llamada GSIII. El gene *glnT* de *R. l. phaseoli* es expresado en *Klebsiella pneumoniae* a partir del promotor del vector, sin embargo no se detecta actividad de GSIII en bacterias de *R. l. phaseoli* en vida libre ni en bacteroides. En este trabajo se reporta la construcción y caracterización de la cepa JG6 de *R. l. biovar phaseoli* que lleva la mutación *glnT::sp*. Se encontró que la cepa JG6 tiene un fenotipo patogénico ya que la inoculación de cultivos de esta cepa a raíces de *Phaseolus vulgaris* fue nociva para el crecimiento de la planta. El efecto de la cepa JG6 se debe a la secreción de un compuesto(s) tóxico. También se encontró que *glnT* es expresado en cultivos de *R. l. phaseoli* en fase estacionaria.

Vo.Bo.



Dra. Guadalupe Espín O.
Asesor.



Josefina Guzmán Aparicio.

INDICE

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 1 |
| Vias de asimilación de amonio en enterobacterias..... | 2 |
| Regulación de la síntesis de glutamina y de la actividad de GS..... | 3 |
| Reulación de la síntesis de GS..... | 5 |
| Via de asimilación de amonio en bacterias de la familia Rhizobiaceae..... | 11 |
| Glutamino Sintetasa I (GS I)..... | 11 |
| Glutamino Sintetasa II (GS II)..... | 13 |
| Glutamino Sintetasa III (GS III) en en <i>Rhizobium</i> | 14 |
| Objetivo..... | 17 |
| Material y Métodos..... | 18 |
| Cepas..... | 18 |
| Reactivos..... | 19 |
| Condiciones de crecimiento de los microorganismos..... | 19 |
| Método para determinar la actividad de GS en células totales..... | 20 |
| Reacción de digestión con enzimas de restricción..... | 20 |
| Condiciones de reacción con la enzima ligasa..... | 20 |
| Purificación del DNA del plásmido por el método de lisis alcalina..... | 21 |
| Preparación de células competentes..... | 22 |

Método de transformación.....22
Purificación del DNA total de cepas de Rhizobium.....22
Resultados.....24
Discusión y Conclusiones.....41
Referencias.....46

Resumen

Rhizobium leguminosarum biovar *phaseoli* ¿Una bacteria simbiótica o patógena?. Una mutación en *glnT* hace la diferencia.

Las bacterias del género *Rhizobium* forman interacciones simbióticas con plantas leguminosas. Esto resulta en la formación de estructuras especializadas, llamados nódulos, en los cuales la bacteria se diferencia en bacteroides y fijan nitrógeno. El amonio producido por los bacteroides es exportado a las células de la planta donde es asimilado. La planta supe de fuente de carbono a la bacteria para satisfacer las demandas de alta energía de la fijación de nitrógeno. Otra característica de las especies de *Rhizobium* es que tienen dos isoenzimas de glutamino sintetetasas: GSI, parecida a las glutamino sintetetasas de enterobacterias, y GSII, similar a las GSs de eucariotes. En *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* se ha demostrado la presencia del gene *glnT* que codifica para una tercera glutamino sintetetasa llamada GSIII. El gene *glnT* de *R. l. phaseoli* es expresado en *Klebsiella pneumoniae* a partir del promotor del vector, sin embargo no se detecta actividad de GSIII en bacterias de *R. l. phaseoli* en vida libre ni en bacteroides. En este trabajo se reporta la construcción y caracterización de la cepa JG6 de *R. l.* biovar *phaseoli* que lleva la mutación *glnT::sp*. Se encontró que la cepa JG6 tiene un fenotipo patogénico ya que la inoculación de cultivos de esta cepa a raíces de *Phaseolus vulgaris* fue nosiva para el crecimiento de la planta. El efecto de la cepa JG6 se debe a la secreción de un compuesto(s) tóxico. También se encontró que *glnT* es expresado en cultivos de *R. l. phaseoli* en fase estacionaria.

Introducción

Las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* forman asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas leguminosas. Esta simbiosis da como resultado la formación de estructuras especializadas, llamadas nódulos, en los que la bacteria se diferencia en bacteroide y fija nitrógeno. Las especies del género *Rhizobium* asimilan el amonio para crecer en vida libre, sin embargo en los bacteroides el amonio producto de la fijación del nitrógeno es exportado a las células de la planta.

La simbiosis entre las bacterias del género *Rhizobium* y las plantas leguminosas se puede ver como una complementación metabólica. La planta provee la energía en forma de fotosintato; los bacteroides sintetizan ATP a partir de este compuesto por medio de la respiración, que se lleva a cabo a bajas tensiones de oxígeno (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 este intercambio (Brewin 1991, Layzell et al 1989, Mellor 1989, Minchin et al 1987, Vance and Hiechel 1991, Witty et al 1986). La simbiosis entre las bacterias y la planta es regulada por el nitrógeno del medio (Strecker 1988). La presencia de nitrato o sales de amonio (nitrógeno combinado) en el medio afecta la simbiosis a diferentes niveles: a) sobre la infección de las raíces por *Rhizobium* b) sobre el número y tamaño de los nódulos, y c) sobre la actividad de la nitrogenasa. A concentraciones crecientes de amonio en el medio, la eficiencia de la simbiosis disminuye, hasta que a ciertas concentraciones la nodulación se inhibe completamente, de manera que cuando hay fertilizante en el suelo, no hay fijación de nitrógeno y el fertilizante se consume. La regulación de la simbiosis por nitrógeno combinado puede ser a través de la bacteria, de la planta o de ambos.

Se ha estudiado 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 encontrado un factor del tallo involucrado en el control que tiene el nitrógeno en 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 de nitrato de amonio por planta 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 de sulfato de amonio por planta se inhibe la formación de nódulos inducidos por *Rhizobium etli* (Espín datos no publicados). Recientemente se aisló una mutante de *R. meliloti* que nodula en presencia de concentraciones de amonio que inhiben la nodulación de la cepa silvestre (Dusha et al 1989). La selección de las 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 se entiendan mejor.

Un estudio sobre la regulación del metabolismo nitrogenado en *Rhizobium* debe considerar al menos tres estados fisiológicos: a) bacterias en vida libre que asimilan varios compuestos nitrogenados dependiendo de si crecen en el suelo o en medios de cultivo en el laboratorio, b) bacterias creciendo activamente dentro de la planta que se originan de una sola célula y que alcanzan hasta 10^9 células hijas, estas deben asimilar fuentes de nitrógeno que provee la planta, y cuya naturaleza se desconoce, c) 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.

Vías de asimilación de amonio en enterobacterias.

Las bacterias de la familia enterobacteracea asimilan el amonio del medio a través de las siguientes vías metabólicas:

1.- Vía de la deshidrogenasa glutámica (GDH) que cataliza la aminación reductiva del 2-oxoglutarato por amonio:



2.- Vía de la glutamato sintasa (GOGAT) que transfiere el grupo

amido de la glutamina al 2-oxoglutarato para formar 2 moléculas de glutamato:



- 3.- Vía de la glutamino sintetasa que cataliza la formación de glutamina a partir de ácido glutámico y amonio:



En altas concentraciones de amonio opera la vía de la GDH la cual tiene una baja afinidad por amonio (K_m de 1mM) (Magasanik 1982). *Escherichia coli* tiene una GOGAT con una alta afinidad por glutamina (K_m de 0.2 mM) (Matzala y Zalkin 1976). La vía para asimilar el amonio, cuando está en concentraciones limitantes es la vía GS-GOGAT. En enterobacterias el uso de estas vías de asimilación de amonio es controlado a nivel genético en respuesta a la concentración de nitrógeno en el medio.

Regulación de la Síntesis de Glutamina y de la actividad de GS.

La glutamina, producto de la actividad de GS, tiene un importante papel en el metabolismo celular, ya que es el precursor de la síntesis de importantes compuestos nitrogenados como son: aminoácidos, purinas, pirimidinas, aminoazúcares, etc. (ver fig. 1). En enterobacterias la GS esta codificada por el gene *glnA*, que es un dodecámero de subunidades idénticas de alrededor de 50 kDa. La GS es una enzima regulada a nivel de la actividad y de su síntesis.

Los mecanismos que regulan la actividad de GS son:

a) Inhibición por retroalimentación por diferentes productos del metabolismo de la glutamina; b) Inactivación de la enzima en respuesta a la concentración de iones divalentes, y c) modulación de la actividad por el mecanismo de adenilación (inactivación) o desadenilación (activación) de cada una de las subunidades de la enzima (Ginsburg y Stadman 1973, Stadman et al 1980, Meister 1980, Rhee et al 1985, Stadman 1990). En la regulación de la actividad por el mecanismo de adenilación intervienen tres proteínas: una enzima bifuncional que es la 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

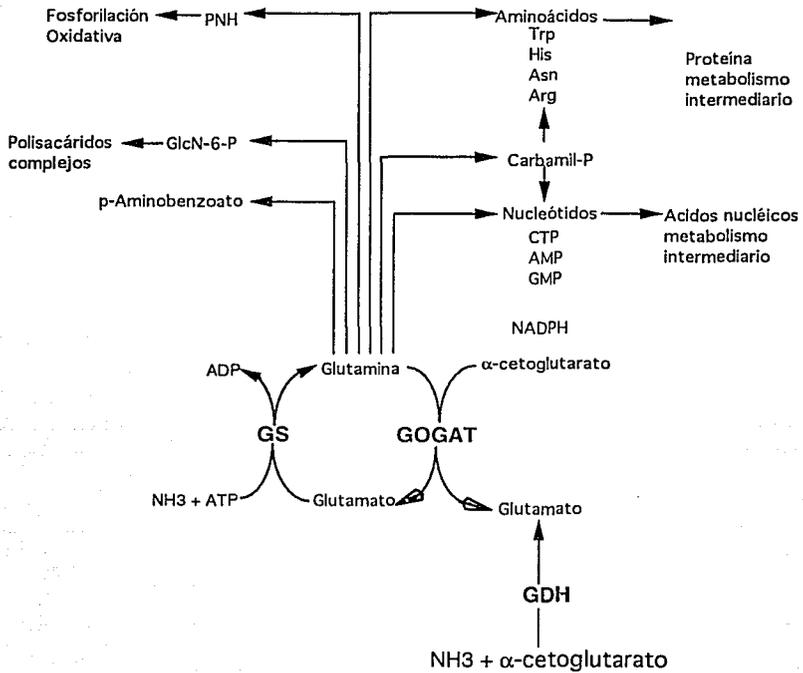


Figura 1. Vías de asimilación de amonio en enterobacterias para la producción de glutamato y glutamina y algunos de los papeles de estos compuestos en el metabolismo intermediario.

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 la cual es codificada por el gene *glnE*. La concentración de nitrógeno disponible 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 limitado de amonio se le agrega un exceso de amonio la relación glutamina/2-oxoglutarato aumenta, lo que inicia una serie de eventos que da como resultado la activación de la UTasa que desuridila a la proteína P_{II} , la que interacciona con la adeniltransferasa, que adenila a la GS. Cuando las células crecen en un medio limitado de amonio, la relación glutamina/2-oxoglutarato baja, lo cual dispara el reverso de las reacciones descritas: inactivación de la UTasa, P_{II} se uridila y la GS se desadenila (ver la fig. 2).

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 *ntxB* (*glnL*) y *ntxC* (*glnC*). Este operón *glnAntrBC* tiene tres promotores *glnAp1*, *glnAp2* (fig. 3), localizados en el extremo 5' del gene y el promotor *ntxBp* situado en la región intergénica de *glnA* y *ntxB*.

La transcripción del gene *glnA* a partir del promotor *glnAp 2* es regulada en respuesta al nitrógeno disponible en el medio por la acción de las proteínas UTasa, P_{II} , NtrB, codificada por el gene *ntxB*, NtrC codificada por *ntxC* y el factor σ -54 de la RNA polimerasa codificado por el gene *ntxA* 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 ácido aspártico, situado en el dominio terminal (Weiss y Magasanik 1988, Keener y Kustu 1988), *ntxB* y *ntxC* 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 crecimiento en donde el amonio está limitado, la UTasa que detecta 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 al medio de crecimiento 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 que da como resultado una disminución en la

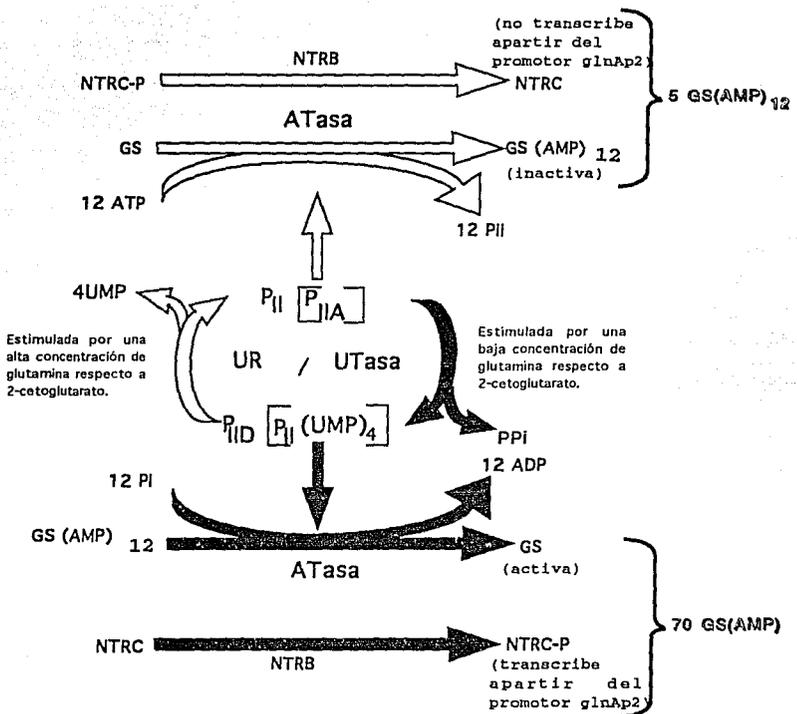


Figura 2. Modificación covalente de la glutamina sintetasa (adenilación de la GS). UR/Utasa, Uridiltransferasa; ATasa, adeniiltransferasa.

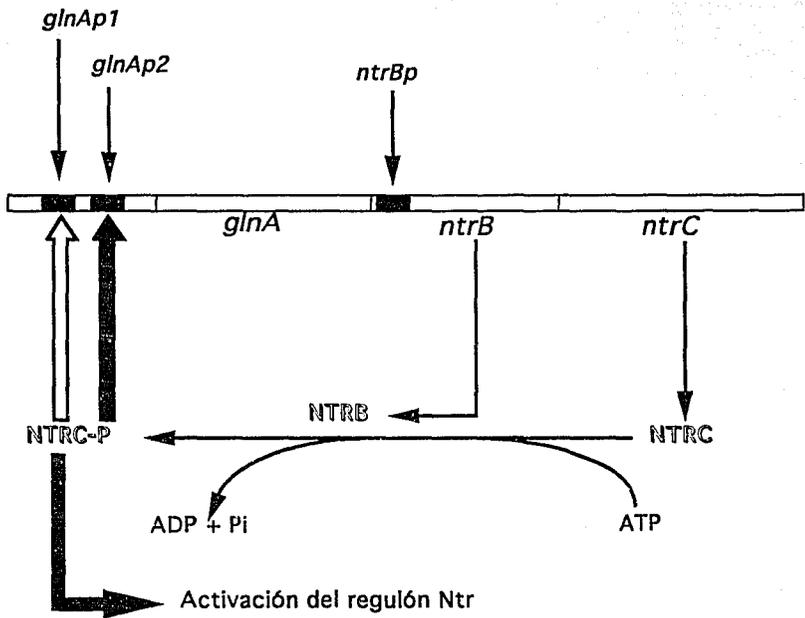


Figura 3. Organización genética del operón *glnA-ntrBC* en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. La flecha sólida indica la regulación positiva y la flecha vacía indica regulación negativa.

síntesis de la GS (Reitzer y Magasanik 1987). (ver la figura 4).

La transcripción del gene *glnA* a partir del promotor *glnAp2* la lleva a cabo la RNA polimerasa que contiene el factor σ -54. Este factor confiere a la RNA polimerasa la especificidad para reconocer promotores que tengan una secuencia consenso específica GG-N₁₀-GC que se localiza 11 a 14 pares de bases por arriba del sitio de inicio de la transcripción; esta secuencia se encuentra en el promotor *glnAp2*, y en otros promotores de genes que codifican para proteínas del metabolismo nitrogenado, como los genes de la fijación de nitrógeno (*nif*) en *K. pneumoniae*. 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 localizadas en el promotor a mas 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 las de los "enhancers" en eucariotes, o sea que pueden funcionar a larga distancia para mejorar la transcripción.

Estos sitios de unión funcionan para unir NtrC al promotor, dan como resultado un aumento en la concentración del activador en la región donde actúa. NtrC reconoce 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). Las asas del DNA que se forman por el contacto de estas dos proteínas se ha visto en el microscopio electrónico (Wen Su et al 1990). Para activar la transcripción, pero no para unirse al DNA, NtrC debe estar fosforilado. 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 efectúa por la polimerasa que contiene el factor σ -70, ya que tienen las secuencias consenso -10 -35 típicas de promotores de bacterias entéricas. La transcripción a través del promotor *glnAp1* es reprimida por NtrC (Reitzer y Magasanik 1985), y es activada por AMPc y CRP. Este es un

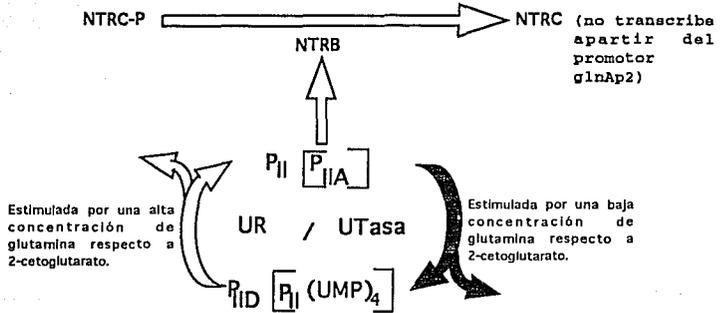


Figura 4. Mecanismo de regulación transcricional del gene *glnA* (que codifica para GS), en respuesta al contenido de nitrógeno intracelular. UR/Utasa, Uridiltransferasa; NTRB, modulador, NTRC efector.

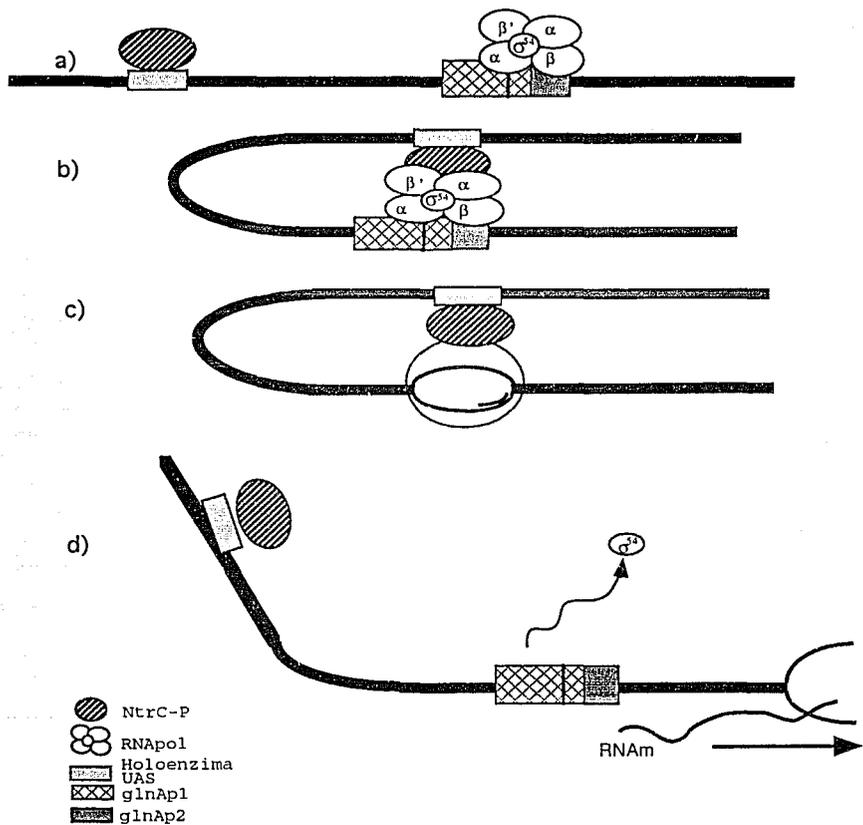


Figura 5. Mecanismo de acción de NtrC-P para activar los promotores regulados por nitrógeno. a) Interacción de NtrC-P (activo) con la secuencia UAS. b) Doblamiento del DNA y la interacción de NtrC-P con la RNAPol holoenzima (core- σ^{54}). c) Formación del complejo cerrado en complejo abierto y d) elongación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

promotor débil que mantiene niveles bajos de transcripción de *glnA* en cultivos en donde el nitrógeno está en exceso y se limita de fuente de carbono el medio de crecimiento.

Vía de asimilación de amonio en bacterias de la familia *Rhizobiaceae* .

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

Glutamina Sintetasa I (GSI)

La GSI es codificada por el gene *glnA* y se parece a la GS de las bacterias entéricas, es una enzima oligomérica estructurada por 12 subunidades idénticas de alrededor de 52 kDa, es estable al calor y regulada por adenilación (Darrow 1980). El gene *glnA* de *R. leguminosarum* biovar *viciae* ya ha sido 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 deducidos para las glutamino sintetetas de *Anabena*, *E. coli* y *Azospirillum brasilensis* respectivamente. En *R. meliloti* (Szeto et al; 1987), *R. leguminosarum* biovar *viciae* (Rossi et al 1989), y *Bradyrhizobium japonicum* (Carlson et al; 1985), la transcripción del gene *glnA* parece ser constitutiva y la GS es también regulada a nivel de su actividad por el mecanismo de adenilación. En *R. leguminosarum* biovar *viciae* se demostró que la adenilación inhibe la actividad biosintética y al igual que en bacterias entéricas la GSI se encontró altamente adenilada en células creciendo en un cultivo con exceso de amonio y poco adenilada en

células creciendo en un cultivo limitado de amonio (Rossi et al 1989).

En *R. etli* antes *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Segovia et al., 1993) encontramos que aunque la GSI se adenila, el mecanismo de adenilación no parece estar regulado por la concentración de amonio en el medio de cultivo, ya que se encuentran grados de adenilación similares tanto en células creciendo en condiciones de limitación de amonio en el medio así como en condiciones de exceso (Noguez et al; 1993). Aunque la actividad de GSI se regula por el mecanismo de adenilación no se conocen bien 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* (Martín et al 1989), y en *R. etli* (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* (Chiurazzi y Iaccarino 1990). El gene *glnB* de *B. 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. etli* mutantes con inserciones de Tn5 en el gene *ntrC* tienen niveles reducidos de la proteína P_{II} (Moreno et al 1992) y la adenilación está también reducida en estas mutantes (Noguez et al 1993). Se han aislado mutantes por inserción de transposones o genes de resistencia a antibióticos en el gene *glnA* que producen mutantes GSI- en *R. meliloti* (Somerville y Kahn 1983) en *B. japonicum* (Carlson et al 1987) y en *R. etli* (Moreno et al 1991). Estas mutantes crecen en amonio como única fuente de nitrógeno debido a la presencia de GSII.

Brown y 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 existencia de dos isoformas de GS. En este mismo estudio la actividad de la GS de los bacteroides se encontró muy baja comparada con la GS presente en las células de planta. Posteriormente Satters et al (1989) utilizando anticuerpos específicos contra la proteína GSII no detectaron dicha proteína en extractos crudos de nódulos de alfalfa, chícharo o soya. En nuestro laboratorio se determinó la actividad de la GS en bacteroides aislados de nódulos inducidos por la cepa silvestre de *R. etli* y de nódulos inducidos por una mutante GSI-. En los bacteroides de la cepa silvestre se detectó solo actividad de GSI y 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 nódulos por planta y fijan más nitrógeno que la cepa silvestre (Carlson et al 1987); la mutante *glnA* - de *R. etli* hace nódulos en frijol pero fija únicamente un 50% de nitrógeno comparada con la cepa silvestre (Moreno et al 1991).

La Glutamino Sintetasa II (GSII)

Esta GS está codificada por el gene *glnII*. La GSII es una enzima octamérica estructurada por subunidades de alrededor de 36 kDa, y es sensible a temperatura, se inactiva completamente cuando se incuba durante 1 hora a 50°C (Darrow 1980). El gene *glnII* de *B. japonicum* se clonó y ha sido secuenciado (Carlson and Chelm 1986). La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia del DNA con otras glutamino sintetetas, mostró que la GSII comparte poca homología con otras glutamino sintetetas de origen bacteriano y mayor con las glutamino sintetetas de plantas, como la GS de *Phaseolus vulgaris* y también con las GSs de animales, (Carlson and Chelm 1986, Shatters y Kahn 1989). En nuestro laboratorio se clonó el gene *glnII* de *R. etli*, la expresión de este gene en *E. coli* depende del sistema *ntr* (Moreno et al 1993). A diferencia de la GSI, los niveles de la actividad de la GSII varía en bacterias creciendo en medios con diferentes fuentes de nitrógeno (Darrow 1980, Howitt y Gresshoff 1985, Martín et al 1988, Bravo y Mora 1988, Espín et al 1990, Moreno et al 1992) o diferentes concentraciones de oxígeno (Rao et al 1987, Adams y Chelm 1988). El efecto del oxígeno y la fuente de nitrógeno sobre los niveles de la actividad de la 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* (Martín et al 1988, Shatters et al 1989) y su transcripción es regulada por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo (Martín 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. etli* depende de la presencia de los genes *ntrC* (de Bruijn et al 1989, Martín 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 GSII en condiciones de crecimiento aeróbico

y limitado de nitrógeno pero no en bacterias limitadas de oxígeno, ni en bacteroides. En *B. Japonicum* la inducción de GSII en un cultivo limitado de oxígeno depende del gene *nifA* cuyo producto activa la transcripción de los genes de la nitrogenasa (Martín et al 1988).

En *R. meliloti* (de Bruijn et al 1989, Somerville et al 1989), *B. Japonicum* (Carlson et al 1987), y en *R. etli* (Noguez et al 1993), se han aislado y caracterizado mutantes estructurales en *GSII*. 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 igual manera que la cepa silvestre, también es capaz de nodular en simbiosis y de fijar nitrógeno.

Los nódulos inducidos por inoculación con esta mutante no presentan actividad de β -galactosidasa.

A diferencia de lo que se encontró en *R. meliloti*, en nódulos inducidos por una cepa silvestre de *B. japonicum* sí 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 cepas de *Rhizobium meliloti* GS- son similares a la de la cepa silvestre (de Bruijn et al 1989, Somerville et al; 1989). La cepa de *B. japonicum* GSII- induce la formación de un mayor número de nódulos y la fijación de nitrógeno está 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. etli*, no se han podido construir dobles mutantes *glnA - glnII* - debido posiblemente a que las cepas de *R. etli* auxótrofas de glutamina no son viables (Moreno y Espín datos no publicados).

Glutamino sintetasa III (GSIII) en *Rhizobium*.

De Bruijn et al (1989) clonaron un fragmento *Bam* HI de 11.2 Kb del genoma de *R. meliloti*. El plásmido 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 que se le llamó *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 formado por varios genes involucrados en la biosíntesis de glutamina. Sin embargo, no detectaron ninguna actividad de GS en las cepas complementadas.

Espín et al (1990) utilizando el plásmido pFB 6162 como detector en un experimento de hibridización tipo Southern, identificaron y clonaron un fragmento *Bam*HI de 12 Kb que contiene el locus *glnT* de *R. etli*; este fragmento no hibridiza con los genes estructurales de la GSI y la GSII de *R. etli*. El plásmido 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 tienen una actividad de glutamino sintetasa (GSIII), con características catalíticas que la distinguen de otras GSs, por ejemplo tiene una relación de actividad biosintética/actividad de transferasa 103 veces mayor que la observada para la GSI o la GSII de *R. etli*.

Se buscó la actividad de GSIII en varias cepas de *R. etli* (silvestre, GSI-, GSII-, NtrC-) crecidas en diferentes condiciones en vida libre y en bacteroides y no se detectó. Se trató de transferir el plásmido pMW5a a varias cepas de *R. etli* para determinar la presencia de GSIII. Con todas las cepas utilizadas aparecían transconjugantes como pequeñas colonias en los medios suplementados con los antibióticos apropiados, pero al ser sembradas al mismo medio selectivo ya no crecían. Este y otros resultados llevaron a concluir que la expresión de la 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 (Espín et al; 1990).

La 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 está estructurada por un solo tipo de monómero de 51 kDa con un punto isoelectrico de 6.2. La afinidad (Km) de la enzima pura para el ATP es de 0.08 mM, para glutámico es de 5.3 mM y para hidroxilamina de 15.5 mM. De estos resultados se encontró que la afinidad por ATP es 10 veces mayor que la afinidad 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 no se detectó la presencia de esta proteína en extractos crudos de cepas de *R. etli* creciendo exponencialmente en vida libre ni en bacteroides.

Por medio de mutagénesis con el transposon Tn5 se delimitó al locus *glnT*, a un fragmento *Bam*HI - *Hind*III de 2.4 Kb al cual se le determinó la secuencia de nucleótidos. El análisis de esta secuencia demostró que había un marco abierto de lectura (ORF) cuyos ocho primeros aminoácidos corresponden a los ocho aminoácidos determinados en la proteína pura, la masa molecular de la proteína deducida de la secuencia es de 48,276 Da que coincide con el valor determinado experimentalmente para la GSIII que es de 51,000 Da. De estos resultados se concluyó que *glnT* es el gene estructural de la GSIII y que *R. etli* tiene tres genes que codifican para tres GSs diferentes (Chiurazzi et al; 1992).

En *R. meliloti* Kahn et al; (1993) encontraron que una mutante WSU650 *glnA* - *glnII* - que pierde la actividad de GS I y GS II, puede crecer sin glutamina en MM solo con amonio y glutamato. Encontraron además que esta cepa tiene una GSIII la cual ha sido purificada y parcialmente caracterizada. La GSIII tiene actividad biosintética considerable pero no tuvo actividad de transferasa. Esta GS fué inhibida por ADP y Pi pero no por otros metabolitos que normalmente inhiben otras GSs. También fué inhibida por metionina sulfoximina, pero la concentración necesaria para inhibir la GSIII fué 50 a 100 veces más alta que la que se requiere para inhibir GS I o GS II. GSIII tiene una Km para glutamato de 13.3 mM, para amonio 33mM, y de 5.3 mM para hidroxilamina con un pH óptimo de 6.8 y una temperatura óptima de 50°C. La proteína purificada esta estructurada por monómeros de 46.5 y 49 kDa y el peso molecular de la proteína nativa es de 355 kDa, lo cual nos dice que la proteína es un octámero.

O b j e t i v o

Rhizobium etli tiene 3 genes que codifican para 3 isoenzimas de GS. El gene *glnA* que codifica para la GSI, *glnII* que codifica para la proteína GSII y *glnT* que codifica para una tercera isoenzima de GS, la GSIII.

La GSI tiene características semejantes a la GS de enterobacterias. La actividad de esta enzima es la única que se ha detectado en bacteroides de nódulos inducidos por la cepa silvestre y mutaciones *glnA*- reducen en un 50% la fijación de nitrógeno, por lo que se ha propuesto que aunque no es esencial, la GSI tiene una función en la simbiosis.

La GSII es una enzima con características parecidas a las GSs de eucariotes. La síntesis de esta enzima es regulada por la fuente de nitrógeno, ya que la actividad de esta enzima es alta en condiciones de limitación de amonio en el medio y baja su actividad en condiciones de exceso de amonio. Una mutante GSII- crece en medio mínimo con un tiempo de duplicación mayor que el de la cepa silvestre por lo que se propone que en vida libre la síntesis de glutamina se lleva a cabo principalmente por esta enzima.

La GSIII es una enzima con características totalmente diferentes a las GSs ya estudiadas. No se ha detectado ni la proteína, ni la actividad de la GSIII en varias cepas de *R. etli* (silvestre, GSI-, GSII-, NtrC-) crecidas en fase exponencial, ni en los bacteroides.

El papel de la GSIII en *R. etli* es un enigma, ya que no se han encontrado las condiciones fisiológicas en las que se sintetiza esta enzima, por lo que no se descarta la posibilidad de que *glnT* sea un gene críptico.

El objetivo de este trabajo es precisamente tratar de saber cual es el papel de *glnT* y su producto la GSIII en *R. etli*, para lo cual se decidió construir una cepa con una mutación en *glnT*.

La caracterización de esta mutante GSIII- en vida libre y en simbiosis sin duda contribuirá a dilucidar el papel de *glnT*.

Material y Métodos

Cepas.

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

| Cepa o Plásmido | Características | Referencias |
|-----------------|---|-------------------------------------|
| pGE 205 | pSUP 202 que contiene un fragmento HindIII-BamHI de 2.4 Kb que contiene el gene <i>glnT</i> . | Espín et al; 1990 |
| HB 101 | Cepa de <i>E. coli</i> Rec A- | Sambrook, Fritsch and Maniatis 1989 |
| pRK2013 | Cepa de <i>E. coli</i> RK2 <i>tra</i> y Nm ^r ligado al replicón Col E1 | Figurski and Helinski 1979. |
| CE-3 | Cepa silvestre de <i>Rhizobium etli</i> . | Noel et al; 1984 |
| SM 58 | <i>glnA</i> :: Km derivada de la CE3 | Moreno et al; 1991b |
| SM 51 | <i>gln</i> ::Sp derivada de la CE3 | No publicada |

Reactivos.

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado analítico. Se utilizaron los antibióticos cloranfenicol 50µg/ml (Cm), tetraciclina 10µg/ml (Tc), espectinomicina 100 o 150µg/ml (Sp), ácido nalidíxico 30µg/ml (Nal), kanamicina 30µg/ml (Km).

Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Medio mínimo para *R. etli* reportado por Noel, et al; (1984). En algunos experimentos se usó el medio mínimo complementado con ácido succínico como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno glutamina, glutamato o amonio a una concentración de 1mg/ml.

Medio Rico. El medio rico para *E. coli* fue LB que contiene 0.5% de extracto de levadura, 1% de peptona de caseína y 0.15 M de cloruro de sodio. El medio rico para *Rhizobium* PY contiene 0.3% de extracto de levadura, 0.5% de peptona de caseína y 7 mM de cloruro de calcio.

Condiciones de Crecimiento de los Microorganismos.

Las cepas de *Escherichia coli* fueron crecidas a 37°C y con agitación constante (en medio líquido) a una velocidad de 200 rpm. Las cepas de *Rhizobium etli* se crecieron a 30°C y en líquido con agitación constante a una velocidad de 200 rpm.

Método para determinar la actividad de la enzima Glutamina sintetasa.

Los ensayos para determinar la actividad de GS se hicieron siguiendo el método reportado por Bender et al (1977). A 400µl de mezcla de reacción que contiene los sustratos de la reacción excepto glutamina (para la reacción de transferasa), y ATP (para la actividad de sintetasa), se agregan 50µl de extracto crudo y la reacción se inicia agregando 50µl de glutamina 20 mM o 60µl de ATP 40 mM respectivamente. El pH para la reacción de transferasa se ajusta a 7.55 y el de la mezcla para la reacción

de sintetasa se ajusta a 7.7. Bajo estas condiciones, una unidad de actividad enzimática da una absorbancia de 0.530 en un minuto a una longitud de onda de 540 nM.

Determinación de la actividad de GS en células totales.

Las cepas se crecen en medio líquido en las condiciones apropiadas. Se toma el cultivo y las células se cosechan por centrifugación a 8000 rpm a 4°C, la pastilla se lava 3 veces con una solución amortiguadora de imidazol a una concentración de 10 mM y cloruro de manganeso 1 mM y a un pH de 7.15 centrifugando y resuspendiendo en cada lavado, finalmente la pastilla de células se resuspende en la misma solución amortiguadora y se procede a determinar la actividad siguiendo el método antes mencionado.

Reacción de Digestión con enzimas de restricción.

Para digerir el DNA con las enzimas de restricción se usaron las siguientes condiciones de reacción:

5 µl del DNA puro (5µg)

2 µl de buffer de reacción

1 µl de enzima (1u/1µg de DNA)

12 µl de agua (o cbp 20µl de reacción)

La reacción se incuba durante dos horas a 37°C o se puede dejar la digestión toda la noche y la reacción se para calentando la mezcla a 65°C durante 10 minutos.

Las digestiones parciales se hacen variando la concentración de enzima de restricción y manteniendo constante el tiempo o bien, variando el tiempo de reacción y manteniendo constante la concentración de enzima. La reacción se para calentando a 65°C durante 10 minutos.

Condiciones de reacción de la enzima ligasa.

Una vez puro el DNA del vector y ya digerido y teniendo el DNA que se va a ligar también puro y digerido con la enzima adecuada para tener extremos compatibles con los extremos del vector se procede a hacer la reacción de ligación de la siguiente manera:

El DNA del vector con respecto al DNA del inserto debe estar en una relación de 1 a 5 ó 1 a 8.

- 1 μl de DNA del vector (0.1μg)/1 unidad de enzima)
- 5 μl de DNA del inserto (0.8μg)
- 2 μl de solución amortiguadora de ligasa
- 1 μl de enzima ligasa (1u/2μg de DNA)
- 11 μl de agua (o cbp 20μl de reacción)

Purificación del DNA de plásmido por el método de lisis alcalina.

Se inoculan 5 ml de medio PY a LB con el antibiótico adecuado, con una sola colonia bacteriana. Se incuba toda la noche a 37°C con agitación.

Vaciar 1.5 ml del cultivo a un tubo eppendorf centrifugar 1 minuto en la microfuga (tirar el sobrenadante y llenar nuevamente el tubo con cultivo, repetir la operación).

Quitar el exceso del medio, dejando la pastilla de bacterias tan seca como sea posible. Resuspender la pastilla en 100μl de una solución fría de glucosa, 50 mM EDTA, 10 mM Tris Hcl, 25 mM a un pH de 8, dejar 5 minutos a temperatura ambiente.

Agregar 200μl de una solución recién preparada y fría de NaOH 2N y SDS al 1%. Cerrar el tubo y mezclar el contenido por inversión del tubo rápidamente 2 ó 3 veces. Poner el tubo en hielo durante 5 minutos.

Agregar 150μl de una solución fría de acetato de potasio a pH de 4.8. Cerrar la tapa del tubo y agitar suavemente en posición invertida durante 10 segundos. Poner en hielo durante 5 minutos y centrifugar durante 5 minutos a 4°C. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio.

Agregar un volumen de 400μl de una mezcla de fenol, cloroformo, isoamílico a una relación 24/24/1 respectivamente. Mezclar la solución y posteriormente centrifugar durante 2 minutos. Transferir el sobrenadante a otro tubo y repetir la operación. Extraer nuevamente con cloroformo-isoamílico y centrifugar.

Pasar el sobrenadante a otro tubo y agregarle 2 volúmenes de etanol, agitar y dejar 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 5 minutos, tirar el sobrenadante e invertir el tubo sobre un Kleenex. Agregar 1 ml de etanol al 70%, agitar y centrifugar. Secar la pastilla en desecador al vacío o a 37°C.

Resuspender la pastilla en 50μl de una solución de Tris 10 mM-EDTA 1 mM que contenga RNAasa libre de DNA a una concentración de 20μg/ml. Guardar a -20°C.

Preparación de células competentes.

Inocular 100 ml de LB con 1 ml de un cultivo de la cepa CMK crecido a 37°C durante 12 horas. Incubar a 37°C por 3 horas o hasta tener una D.O. de 0.4 ó 0.5 a 650nm.

Poner el cultivo en hielo durante 10 minutos. Centrifugar el cultivo a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tirar el sobrenadante.

Resuspender las células en 50 ml de una solución de CaCl₂ fría y estéril a una concentración de 50mM. Dejar en hielo 15 minutos y centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Desechar el sobrenadante.

Resuspender las células en un volumen de 3 a 5 ml de CaCl₂ 50mM (frío). Fraccionar en tubos de 0.2 ml cada uno y almacenar las células antes de usarlas, durante 12 a 24 horas a 4°C. Esto aumenta su capacidad de transformación.

Las células que no se van a usar después de este tiempo, agregarles glicerol al 14% en CaCl₂ 50mM y almacenarlas a -70°C.

Método de transformación.

A 0.1µg de DNA ligado (DNA del vector + inserto), agregarle 0.2 ml de células competentes; como control de transformación poner otro tubo con 1 µg de vector + .2 ml de células (control positivo) y otro con .2 ml de células (control negativo). Dejar en hielo durante 30 minutos.

Dar un cambio brusco de temperatura, incubando los tubos a 37°C por 5 minutos ó a 42°C por 2 minutos.

Agregar a cada tubo 1 ml de LB sin antibiótico e incubar a 37°C durante 30 minutos si se va a seleccionar resistencia a Tc, 1 hora si la selección va a hacerse para Ap ó Km y 2 horas si se va a seleccionar para Cm.

Sembrar de los tubos de cultivo a cajas de LB (con el antibiótico a seleccionar), para tener colonias aisladas y poder posteriormente hacer la selección a los antibióticos apropiados.

Purificación de DNA total de cepas de *Rhizobium*.

Inocular un volumen de 5 ml de PY-Ca²⁺ (10mM) con una azada abundante de la cepa en cuestión.

Inocular durante 16 a 24 horas a 30°C con agitación y en la oscuridad.

Tomar una azada y estriar sobre PY-agar, como control de contaminación e incubar a 30°C.

Centrifugar los 5 ml de cultivo en un eppendorf.

Resuspender la pastilla celular en 1 ml de solución amortiguadora de Tris 50 mM, EDTA 20 mM pH 8 (TE pH8) (esta puede hacerse en vortex o con pipeta Pasteur).

Centrifugar y resuspender en 0.4 ml de TE pH8 (50/20).

Adicionar 0.050 ml de una solución de Pronasa a una concentración de 5 mg/ml (predigerida por 1 hora 37°C) en TE pH8 (50/20).

Adicionar 0.050 ml de una solución de SDS al 10% en TE pH8 (50/20) mezclar por inversión varias veces e incubar a 37°C durante 60 minutos. Agregar RNAsa a una concentración de .2 mg/ml.

Pasar por jeringa de 1 ml 2 ó 3 veces.

Extraer de 2 a 5 veces con un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24/24/1) saturado con buffer Tris EDTA pH8 (10/1 mM) con agitación hasta obtener una emulsión y centrifugar.

Tomar la fase acuosa y extraer 2 veces con un volumen igual de cloroformo-isoamílico de la misma manera que el paso anterior.

Medir la fase acuosa y adicionar 1/10 del volumen de CH₃CooNa 3M y 2 1/2 volúmenes de etanol frío.

Dejar precipitando 2 horas a -20°C durante 2 horas.

Centrifugar 15' a 4°C en la microcentrífuga y lavar 3 veces con etanol al 70%.

Secar la pastilla en un evaporador con vacío.

Resultados

Obtención de la cepa JG6 (GSIII-) de *R. etli*.

Para estudiar el papel de *R. etli* en vida libre y en simbiosis se construyó una cepa GSIII-, para lo cual se construyó el plásmido pJG6.

Para la obtención de este plásmido se purificó un fragmento *EcoRI* de 2 kb con resistencia a espectinomicina a partir del plásmido pHP45 Ω . Este fragmento se clonó en el único sitio *EcoRI* presente dentro del gene *glnT* del plásmido pGE 205, Fig 6.

El pGE 205 se digirió parcialmente con la enzima *EcoRI* y por la acción de la enzima ligasa se unió la digestión parcial del pGE 205 con el fragmento de resistencia a Sp. Por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en una solución amortiguadora de tris acetato, se comprobó que efectivamente se ligó el fragmento de 2kb a la parcial del pGE 205.

Una vez comprobada la ligación se hace una transformación en la cepa HB101 con el pGE 205::Sp utilizando el método reportado por Cohen et al 1970. Las células transformadas fueron seleccionadas por resistencia a Sp por el fragmento con el que se interrumpió *glnT* y que tiene resistencia a Cm por el pGE 205.

Se seleccionaron 5 transformantes a las que se les purificó el DNA plasmídico. Por análisis con enzimas de restricción se comprobó que en algunas el fragmento de resistencia a Sp se insertó en el único sitio *EcoRI* que contiene el gene *glnT* y no en el sitio *EcoRI* del vector, para lo cual se hace una digestión del DNA del pJG6 con la enzima *BamHI*, que nos permite distinguir por el patrón que nos dá que el fragmento se insertó en el sitio deseado. Se escogió uno de estos plásmidos (pJG6) para continuar con su análisis.

Obtención de la mutante JG6 de *R. etli*.

Para obtener la cepa de *R. etli* GSIII- se utilizó el plásmido pJG6 el cual es suicida en *R. etli* (porque no se puede replicar) y fué transferido por conjugación a la cepa silvestre CE3 para cambiar el *glnT*+ por el *glnT*::Sp . Se hizo una cruce triparental utilizando cultivos de la cepa CE3 de *R. etli* , de la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido pJG6 y de la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido pRK2013. En una caja de Petri con

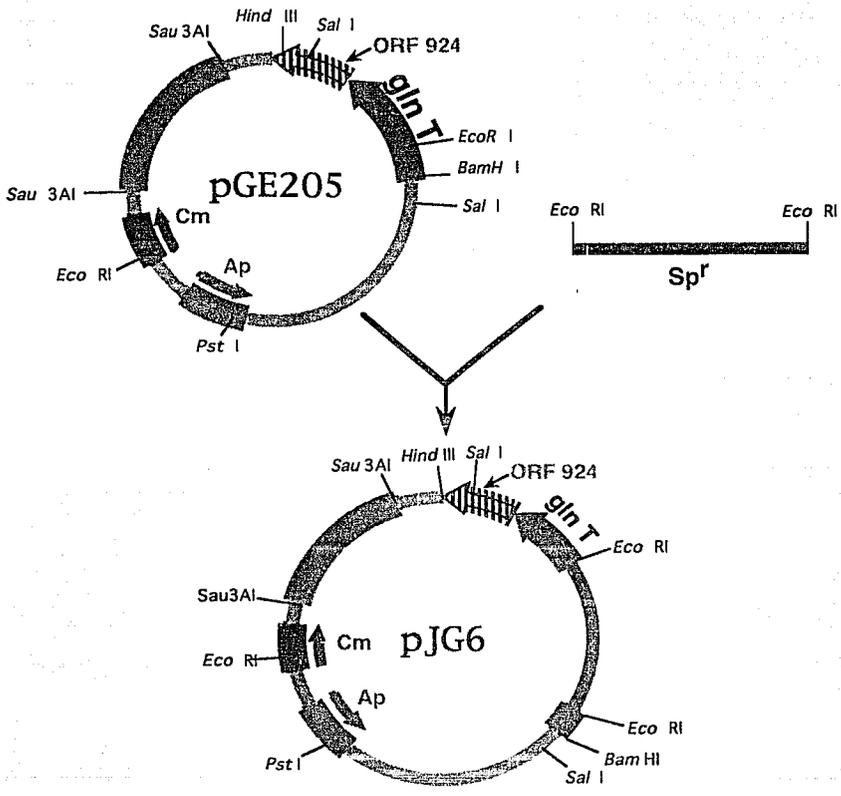


Fig. 6.- Construcción del plásmido pJG6

medio LB se mezclaron 100µl del cultivo de la cepa CE3, 10µl de las dos cepas de *E. coli* que contienen los plásmidos pJG6 y pRK2013 y se incuban 24 horas a 30°C. Posteriormente se recoge la cruza, se resuspende en 1 ml de NaCl 10mM y se siembran diferentes diluciones en cajas de Petri con medio PY + ac. nalidíxico y espectinomicina para seleccionar colonias aisladas de *Rhizobium etli* que lleven la inserción *glnT::Sp*. Posteriormente se pican las colonias en Cm y las que son sensibles a este antibiótico (marcador del vector) se seleccionan.

De 30 de estas colonias se purifico el DNA total y se digiere con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Para comprobar la mutación por hibridización tipo Southern (Maniatis 1984), los DNAs digeridos se hibridizaron con el fragmento *HindIII*- *BamHI* de 2.4 Kb del *glnT* del plásmido pGE205. Una de estas colonias que dió el patrón de hibridización esperado por el reemplazamiento de *glnT* se escogió y se obtuvo la mutante JG6. Fig. 7

Obtención de la mutante JG7 (GSIII-GSI-) de *R. etli*.

Para obtener esta mutante se utilizó como receptora la cepa JG6 (GSIII-), el plásmido pSM58 (*glnA::Km*) y el pRK2013 como ayudador. Se hace la cruza como se mencionó en el párrafo anterior y la selección de las colonias se realizó en medio PY con ácido nalidíxico, kanamicina *glnA* y espectinomicina *glnT*. En este caso a las colonias que presentaron resistencia a estos antibióticos y sensibilidad a Cm (plásmido), se les midió actividad de GS en células totales. De esta manera se seleccionaron las cepas sin actividad de GSI. Se purificó el DNA total y se digirió con la enzima *BamHI* para hacer una hibridización tipo Southern (Maniatis 1989), utilizando como probador el pSM58 para comprobar que contiene la mutación *glnA::Km*. Fig 8.

Crecimiento de las cepas JG6 y JG7.

Para determinar si la mutación *glnT::Sp* tiene algún efecto sobre su crecimiento en vida libre, se crecieron estas cepas en medio mínimo con amonio, glutamato o glutamina como fuente de nitrógeno y succinato como fuente de carbono. El crecimiento se hizo durante 12 horas a 30°C tomando muestras de los cultivos a las 3, 6, 9 y 12 horas de crecimiento y midiendo la densidad óptica a 590 nm. En las cepas que contienen la

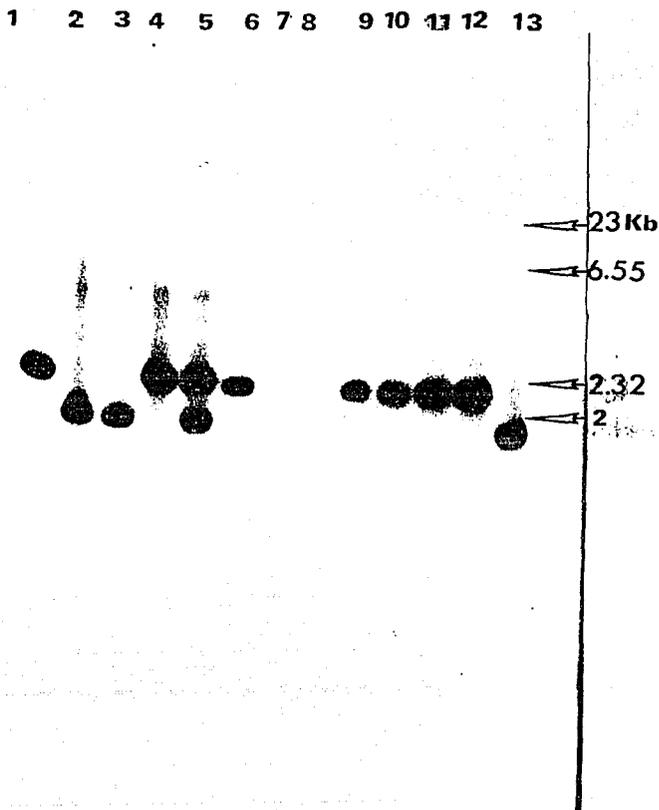


Fig. 7.- Hibridación de la cepa JG6.

DNAs de la cepa CE3 y de las mutantes GSIII- "candidatas", digerido con las enzimas *HindIII* y *BamHI* e hibridizadas contra el fragmento *HindIII* - *BamHI* de 2.4 Kb (*glnT*) del pGE205. Carril 1, patrón de hibridización del DNA de la cepa CE3; del carril 2 al carril 6, "candidatas"; carril 7, Marcador de Pesos Moleculares (DNA del fago λ digerido con la enzima *HindIII*). Del carril 8 al 13 "candidatas."

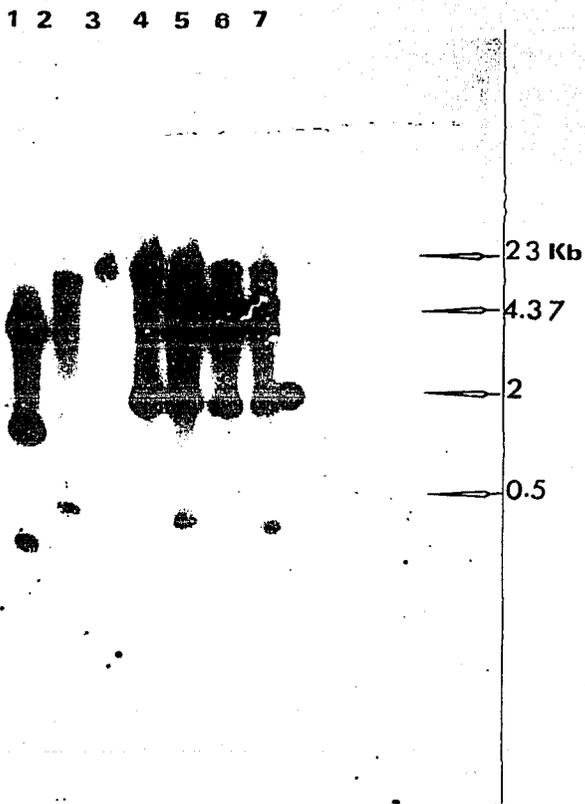


Fig. 8. Hibridación de la cepa JG7.

DNAs de las cepas SM58, JG6 y de las mutantes "candidatas" GSI- GSIII - digeridas con la enzima *Bam*HI e hibridadas contra el DNA del plásmido pSM58. Carril 1, patrón de hibridización del DNA de la cepa SM58; carril 2, patrón de hibridización de la cepa JG6; carril 3, Marcador de Pesos Moleculares; del carril 4 al carril 7 "candidatas."

mutación *glnT::Sp* se observa un retardo al inicio del crecimiento, pero en la fase exponencial el tiempo de duplicación de estas cepas fue similar al de la cepa silvestre. Fig. 9

Caracterización simbiótica de las cepas JG6 y JG7.

Para determinar las propiedades simbióticas de las cepas JG6 y JG7, se crecieron en PY con los antibióticos correspondientes a 30°C hasta la fase estacionaria de crecimiento y se inoculó un lote de *Phaseolus vulgaris* (variedad negro jamapa), con 1.5 ml de cada cultivo y un lote se dejó sin inocular.

Como control en este experimento se utilizaron las cepas CE3, SM58 que es GSI-, SM51 que tiene insertado un fragmento de resistencia a espectinomicina en el sitio *Hind* III, a 2 Kb del extremo 3' de *glnT*.

Toda la manipulación anterior se hace en una campana de flujo laminar. Posteriormente se siembran las semillas germinadas en macetas estériles con vermiculita y se pone 1.5 ml de cultivo sobre cada semilla. Dos días después de la inoculación, se riegan las macetas cada tercer día con agua estéril y solución nutritiva (Noel et al; 1984).

Las macetas se ponen en el invernadero; a los 20 o 21 días después de inoculadas las semillas, se sacan las plantas y se les mide a los nódulos la actividad de la enzima nitrogenasa con el método de reducción de acetileno. La cuantificación de etileno se hace por cromatografía de gases. Las condiciones de crecimiento descritas anteriormente se usaron generalmente, excepto en los casos en los que se especifique otras.

Como era de esperarse el desarrollo de las plantas de frijoles inoculados con la cepa CE3, SM58 y SM51 fué normal, raíz bien desarrollada, forman nódulos y fijan nitrógeno. Sorprendentemente se observó que en el lote de plantas de frijoles inoculados con la cepa JG6 y la cepa JG7 alrededor del 90% se murieron; la mayoría no desarrolló el primer trifolio y las hojas de los cotiledones se secaron. Estas plantas no desarrollaron su raíz, y las que lograron sobrevivir presentaron cambios drásticos en su fenotipo: raíz poco desarrollada y hojas con pigmentaciones blancas. Fig. 10, 11 y 12.

Inoculación de *Phaseolus vulgaris* con el filtrado del cultivo de la cepa JG6.

Para probar si el efecto tóxico del cultivo de estas cepas sobre

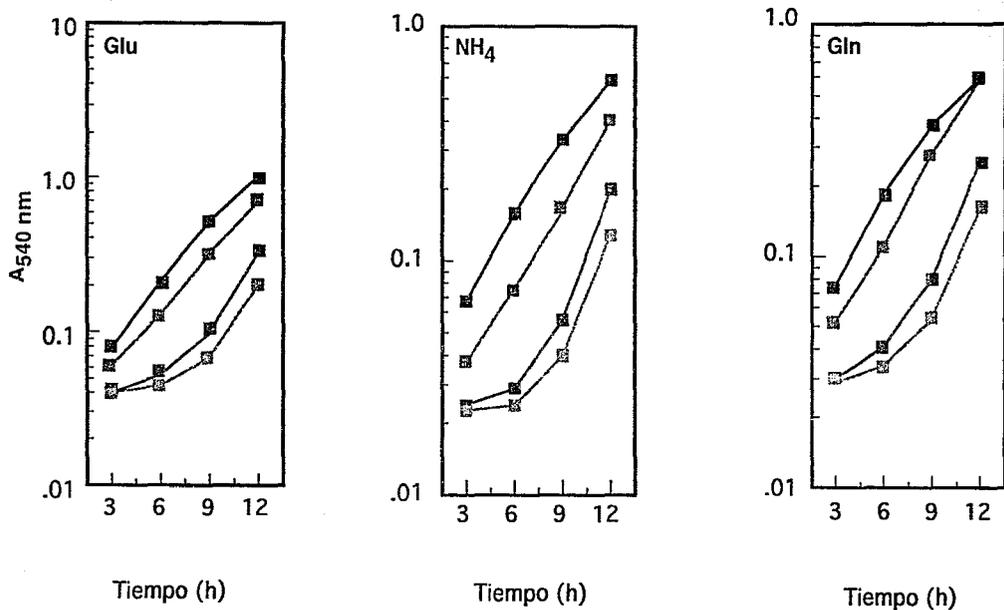


Fig. 9 Crecimiento de diferentes cepas de *Rhizobium etli* CE3 (—■—), SM58 (—■—), JG6 (—■—), JG7 (—■—) en MM complementado con 1 mg/ml de Glutamato (Glu); sulfato de Amonio (NH₄); Glutamina (Gln); como fuente de nitrógeno.

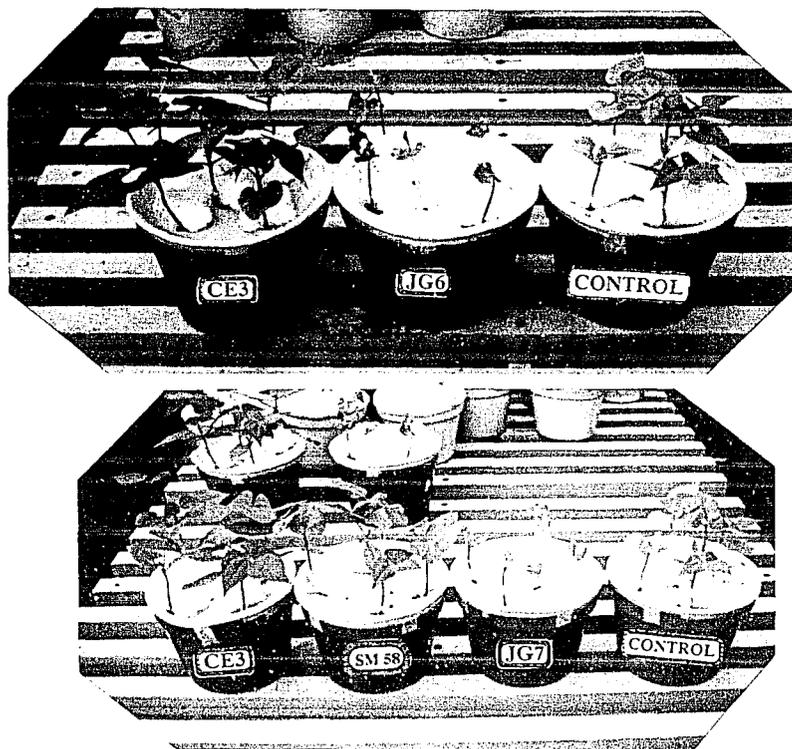


Fig. 10. Efecto de los cultivos de las cepas CE3, JG6 y JG7 en plantas de *Phaseolus vulgaris* .

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* se germinaron durante 5 días y se inocularon después de sembradas, con el cultivo de diferentes cepas de *R. etli* .

Las fotografías se tomaron 21 días después de inoculadas las semillas. El control son plantas de semillas sin inocular.

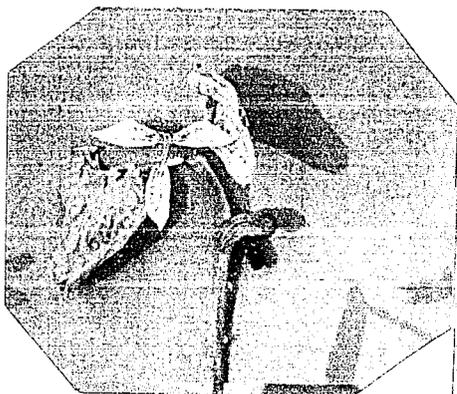
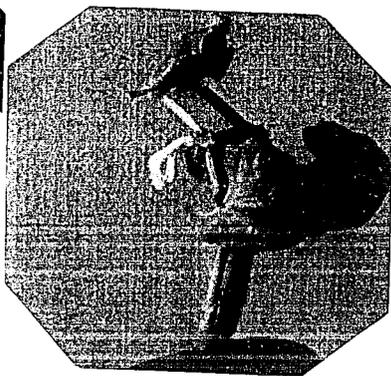


Fig. 11. Daño causado en las plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con cultivos de la cepa JG6.

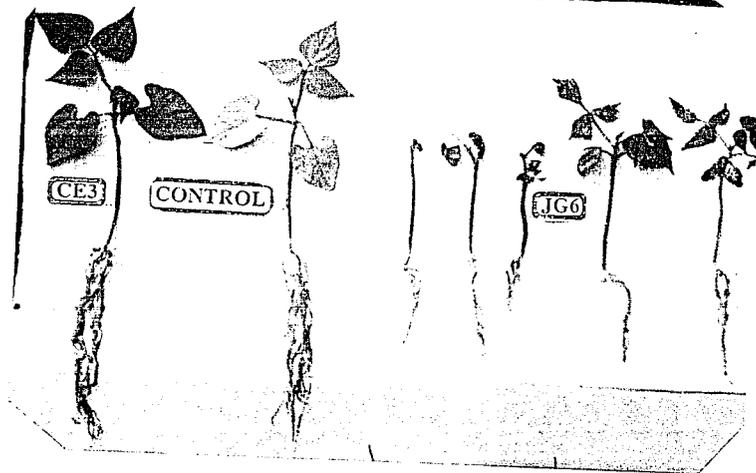
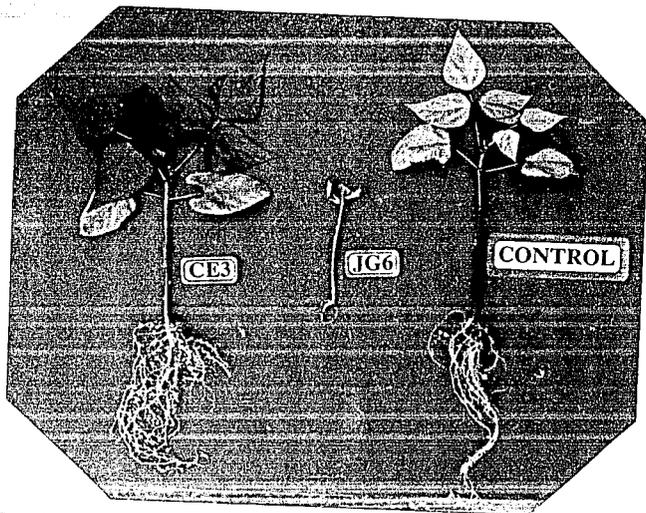


Fig. 12. Efecto del compuesto tóxico secretado por la cepa JG6 en el desarrollo de la raíz.

frijol es causado por algún compuesto(s) secretado por la mutante, un cultivo de la cepa JG6 se filtró y con el medio libre de bacterias, se inoculó frijol germinado. También se inocularon semillas germinadas con las bacterias lavadas y resuspendidas en el mismo medio de crecimiento. El daño causado a las plantas por el filtrado fué igual al causado cuando se inoculó *Phaseolus vulgaris* con el cultivo de bacterias. Fig. 13.

Inoculación de *Phaseolus vulgaris* con diluciones del cultivo de la cepa JG6.

Para ver el efecto de la dosis del compuesto secretado por la cepa JG6 sobre *Phaseolus vulgaris*, el cultivo de la cepa JG6 se diluyó con medio de crecimiento PY para tener la siguientes diluciones: 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10. Con estas diluciones se inocularon las semillas germinadas para observar el efecto de la dosis.

Se observó que el efecto tóxico de los cultivos de la cepa JG6 en *Phaseolus vulgaris* depende de la concentración, ya que una dilución del cultivo 1:1 reduce el efecto, mientras que si se diluye 1:10 el efecto se anula. Fig. 14.

Inoculación de *Phaseolus vulgaris* con cultivos de la cepa JG6, 3 y 6 días después de sembradas las semillas.

Se sembraron 6 lotes de semillas con 25 cada uno: un lote se inoculó al momento de la siembra con 1.5 ml de cultivo de la cepa JG6, tres días después se inocularon 2 lotes, uno con 1.5 ml. de medio de cultivo y el otro con 5 ml. 6 días después se inocularon otros 2 lotes igual que los dos anteriores y un lote no se inoculó.

En los frijoles inoculados con 1.5 ml. de cultivo de la cepa JG6 3 y 6 días después de sembrados solo se observó una pequeña disminución en su crecimineto, mientras que en los que se inocularon con un volumen mayor (5 ml) si sufrieron daño. Fig. 15.

Inoculación de *Phaseolus vulgaris* con cultivos de la cepa JG6 crecida en medio mínimo.

Si se inocula *Phaseolus vulgaris* con el cultivo de la cepa JG6 crecido en medio mínimo con glutamato como fuente de nitrógeno y

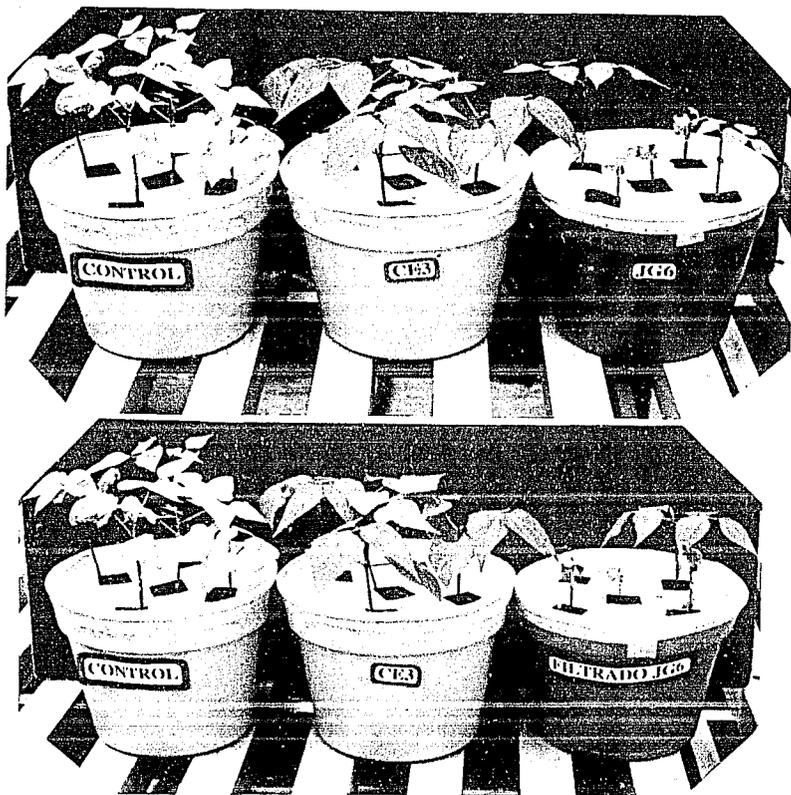


Fig. 13. Efecto de la inoculación de semillas de *Phaseolus vulgaris* con el sobrenadante del cultivo de la cepa JG6.



Fig. 14. Efecto de la inoculación de *Phaseolus vulgaris* con cultivos de la cepa JG6 diluidos.

Cada hilera de macetas corresponde a diluciones crecientes de adelante hacia atrás: 1:2, 1:4 y 1:8.

a, cultivo sin diluir; b, cultivo diluido 1:10; c, CE 3.

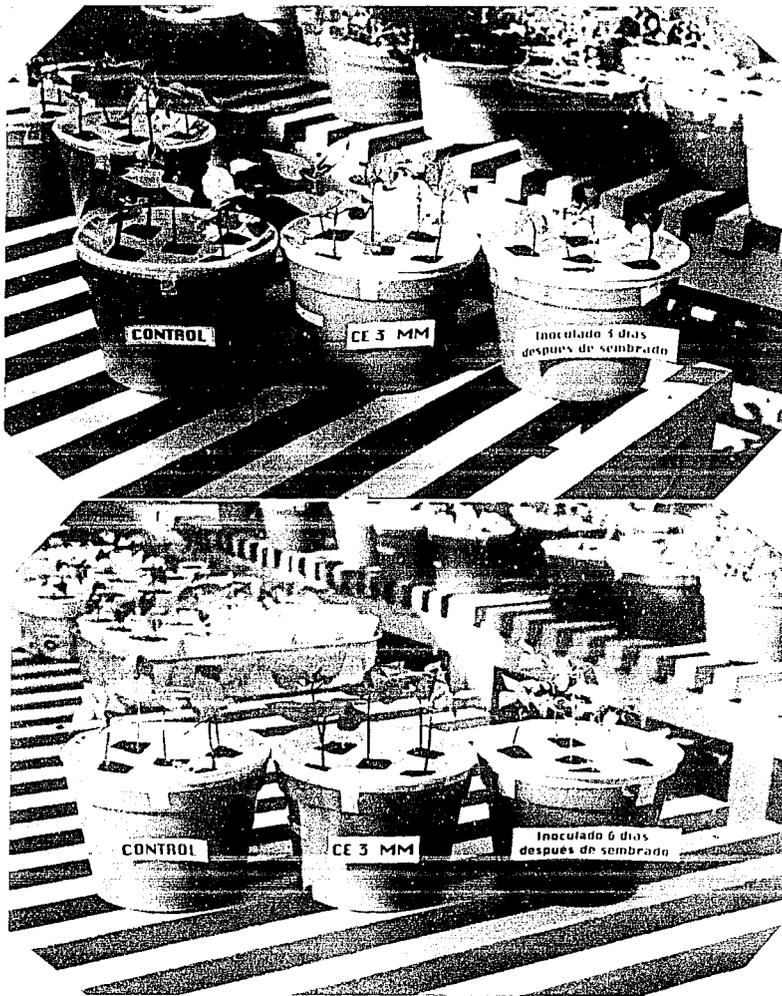


Fig. 15. Efecto de la inoculación de semillas *Phaseolus vulgaris* con el cultivo de la cepa JG6, 3 y 6 días de sembradas.

succinato como fuente de carbono se observa el mismo efecto que cuando se crecen en medio rico. Fig. 16.

Inoculación de Chícharo y Cacahuete con cultivo de la cepa JG6.

Para determinar la especificidad del efecto tóxico de la cepa JG6 se inocularon con cultivos de esta cepa semillas de chícharo y cacahuete y se observó que estas leguminosas también son sensibles al compuesto(s) tóxico. Aunque el efecto se ve solo cuando se inoculan con un volumen mayor (5 ml) al usado en frijol (1.5 ml). En estas condiciones se observó un retraso en el desarrollo de la planta. Fig. 17



Fig. 16. Efecto de la inoculación de *Phaseolus vulgaris* con cultivos de las cepas CE3 y JG6 crecidas en medio mínimo.



Fig. 17. Inoculación de chícharo y cacahuete con el cultivo de la cepa JG6.
a) inoculadas 3 días después de sembradas las semillas.

Discusión

Anteriormente se publicó que no se detectó la actividad de la enzima GSIII en varias cepas de *R. etli* creciendo exponencialmente en diferentes condiciones. También se demostró por análisis con anticuerpos dirigidos contra la GSIII purificada de *K. pneumoniae*, que los anticuerpos no cruzan con bacteróides ni con extractos de cultivos de *R. etli*, creciendo exponencialmente lo cual sugería que el gene *glnT* no se expresaba en las condiciones probadas (Chirazzi et al, 1992).

Teniendo como antecedentes estos resultados para tratar de dilucidar cual es el papel de el gene *glnT* y de su producto la GSIII en *R. etli* tanto en vida libre como en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* se construyó la mutante JG6.

El fenotipo tóxico de los cultivos en fase estacionaria de la cepa JG6 sugiere que es en esta etapa de crecimiento donde se expresa el gene *glnT*, ya que es en cultivos en fase estacionaria y no en cultivos en crecimiento exponencial cuando el cultivo produce un daño para las plantas.

La mutación en el gene *glnT* (GSIII-), causa la secreción de un compuesto(s) que produce un efecto nocivo cuando el cultivo de la JG6 es inoculado a semillas de *Phaseolus vulgaris*, inhibiendo el desarrollo de la planta. Este fenotipo no se observa en mutantes en el gene *glnT* de *R. meliloti* que han perdido la actividad de GSIII. Esta discrepancia podría deberse a que: a) las semillas de alfalfa se inocularon con los cultivos de bacterias lavadas, b) la pérdida de la actividad de la GSIII en *R. meliloti* no se debe a una mutación estructural, y c) en *R. meliloti* las cepas con la mutación en *glnT* no secretan ningún compuesto.

Se puede proponer que en *R. etli* los sustratos de la GSIII son glutamato y/o algún análogo de este aminoácido y que la síntesis de glutamina sea una actividad secundaria de esta enzima y que la actividad principal de la GSIII sea la de metabolizar este análogo el cual en ausencia de la actividad de la GSIII se acumula y es secretado por la célula al medio. En *K. pneumoniae* donde se expresa el gene *glnT* de *R. etli* la actividad principal sí parece ser la de sintetizar glutamina.

Esta hipótesis se basa en las características tan diferentes que tiene la GSIII comparada con otras GSs ya estudiadas por ejemplo:

a) La GSIII tiene una actividad biosintética muy alta y no tiene actividad de transferasa. En todas las GSs la relación de la actividad

biosintética/actividad de transferasa es menor de 1.

b) La afinidad de esta enzima GSIII para ATP es muy alta y baja para glutamato y amonio. (Shatters, et al., 1993, Churazi et, al.,1992)

c) La GSIII de *R. meliloti* puede usar como sustrato un dipéptido de glutamina (M. Kahn comunicación personal).

d) Se ha publicado que un análogo de glutámico que es la fosfinotricina (Pt) tiene actividad de herbicida y bactericida, es un potente inhibidor de la GS de bacterias y plantas.

Shatters et al, (1993) en base a las características de la GSIII también proponen que la síntesis de glutamina por esta enzima pudiera ser una actividad secundaria y que la proteína pudiera tener otra actividad enzimática principal.

Propiedades simbióticas de la cepa JG6.

La inoculación de *Phaseolus vulgaris* con bacterias de la cepa JG6 lavadas con agua no causan daño a las plantas, ya que la raíz se desarrolla normalmente, las bacterias penetran e inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno al igual que la cepa silvestre. *Phaseolus vulgaris* inoculado con cultivos de la cepa JG6 diluidos 1:10 que ya no dañan drásticamente las plantas, también desarrollan su raíz y forman nódulos fijadores de nitrógeno al igual que las plantas resultantes de la inoculación de *Phaseolus vulgaris* 3 y 6 días después de sembrados. De estos resultados se concluyó que la enzima GSIII no se requiere para que *R. etli* establezca una simbiosis efectiva con *Phaseolus vulgaris*.

Otra hipótesis basada en los resultados mencionados en el párrafo anterior es que el efecto que causa el compuesto(s) secretado por la cepa JG6 es inhibir la división celular de raíz, ya que, como se observa en la figura 12, cuando se inocula *Phaseolus vulgaris* con el cultivo de la cepa JG6 sin diluir no hay formación de raíz; en la figura 14 observamos que el efecto del compuesto depende de la dosis y el daño en la planta está directamente relacionado con el desarrollo de la raíz.

Las cepas con la mutación en *glnT* crecen en medio mínimo con un tiempo de duplicación igual al de la cepa silvestre, por lo que se supone que esta enzima no participa en la vía de síntesis de algún metabolito esencial, sino que podría participar en una vía de metabolismo secundario.

En *R. etli* se demostró que *glnT* es parte de un operón, ya que tiene un marco de lectura abierto de 924 nucleótidos (ORF 924) localizado 47

nucleótidos abajo del codón de término TGA de *glnT*, y no se encontró un promotor dentro de los 106 pares de bases secuenciadas hacia arriba del codón de inicio ATG de *glnT* (Chiurazzi et al, 1992). La mutación *glnT::Sp* puede ser polar sobre los genes localizados en el extremo 3' de abajo del ORF de 924, por lo tanto el metabolito(s) que se acumula y secreta pudiera ser sustrato de una enzima (producto de la expresión del ORF) cuya expresión fué afectada por la mutación en el gene *glnT*.

Para aclarar lo anterior se construirá una cepa con una mutación en el ORF 924. Fig. 18.

Si el efecto del cultivo de la JG6 en *Phaseolus vulgaris* se debe a la mutación en el gene *glnT*, se podría revertir el efecto si expresamos *glnT* a partir de un promotor *glnT* constitutivo en la cepa JG6.

De los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que:

- 1.- El efecto tóxico de los cultivos de la JG6 en fase estacionaria sobre *P. vulgaris*, indica que *glnT* si se expresa.
- 2.- El efecto tóxico observado en plantas inoculadas con cultivos de la cepa JG6 también se observa en plantas inoculadas con el sobrenadante de estos cultivos, por lo que concluimos que la mutación *glnT::Sp* causa la acumulación y secreción de un compuesto(s) que es tóxico para *P. vulgaris*.
- 3.- Cuando las semillas de *P. vulgaris* germinadas son inoculadas con cultivos lavados se observa el desarrollo de la raíz y la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, indicándonos que las propiedades simbióticas de la cepa JG6 no se ven afectadas por la mutación en *glnT*.
- 4.- El efecto tóxico del compuesto(s) secretado por la cepa JG6 es inhibir el desarrollo de la raíz.
- 5.- El efecto de este compuesto(s) en *P. vulgaris* depende de la dosis.
- 6.- Debido a que la mutación *glnT::Sp* de la cepa JG6 puede ser polar en los genes localizados abajo del ORF924, el fenotipo tóxico de la cepa JG6 puede deberse a la ausencia del producto de *glnT* y/o al

ORF ó a la acumulaci3n del sustrato de GSIII o del producto g3nico del ORF924.

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.

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

Chiurazzi, M., Meza, R., Lara, M., Laham, A., Defez, R., Iaccarino, M. and Espín, G. (1992) The *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. Gene **119**: 1-8.

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.

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 presence of ammonium. Mol. Gen. Genet. **219**: 89-96.

- 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.
- Figurski, D.H. and D.R. Helinski (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc. Natl. Sci. USA* **76** :1648-1652
- 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.
- 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. (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* *ntrC* 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 lentic 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.

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

Moreno, S., Noguez, R., Guzmán, J., & Espín, G., (1993) Construction and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain carrying a *glnII:Sp* insertion mutation, and a study on the adenylation of glutamine synthetase I. In *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Eds. R. Palacios. Kluwer Academic Publishers p. 557.

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., Moreno, S., Guzmán, J. and Espín, G. (1993) The effect of the nitrogen source and *ntrC* on the adenylation of GSI in *Rhizobium etli*. Sometido a publicación.

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.

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, pp 302-320.

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.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Segovia, L., Young, P. y Martínez-Romero, E. (1993) Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type 1 strains as *Rhizobium etli* Sp. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology. **43**: 374-377.

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.

Shatters, R.G., Liu, Y. and Kahn, M.L. (1993) Isolation and characterization of a Novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. **268**, No. 1. pp 469-475.

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. 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 promoter 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.