



Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades

"OBTENCION Y ANALISIS DE MUTACIONES QUE AFECTAN
LA ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA Y DE LA GLUTAMINO
SINTETASA EN *Rhizobium phaseoli*"

T E S I S
Que para obtener el Título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica
P r e s e n t a

JUAN ENRIQUE MORETT SANCHEZ

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno

28289



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del
Colégio de Ciencias y Humanidades. Centro de Investigación
sobre Fijación de Nitrógeno

1984

"Si nos olvidásemos de los viajes interplanetarios y nos ocupáramos más del ácido desoxirribonucleico, que se introduce como una llave en la célula por el mismo procedimiento que la espectroscopía nasal de los olores, estaríamos mucho más cerca de la inmortalidad"

S. Dalí.

A mis padres

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
Regulación de la Fijación de Nitrógeno en <u>Klebsiella pneumoniae</u>	5
Regulación de la Fijación de Nitrógeno en Bacterias del Género <u>Rhizobium</u>	9
Estudio de la Regulación Genética de la Fijación de nitrógeno en <u>Rhizobium phaseoli</u>	11
METODOLOGIA.....	14
Cepas bacterianas y Plásmidos.....	14
Medios y Condiciones de Cultivo.....	14
Mutagenesis con Transposón y Selección de las Cepas MS Sensibles.....	14
Determinación de las Actividades Enzimáticas de la Glutamino Sintetasa..	17
Separación de GSI y GSII en Gradientes de sacarosa.....	17
Determinación del patrón de plásmidos de <u>Rhizobium phaseoli</u>	17
Purificación de DNA y Condiciones de digestión.....	--
Condiciones de Hibridización.....	17
Determinación de la Nodulación y de la Fijación de Nitrógeno.....	19
Aislamiento de RNA de <u>Rhizobium phaseoli</u>	19
Determinación de Proteína.....	20
RESULTADOS.....	21
Aislamiento de Mutantes Sensibles a MS.	21
Caracterización Genética de las Mutantes.....	22
Actividad de Glutamino Sintetasa de las mutantes MS-s.....	24
Propiedades Simbióticas de las Mutantes MS-s.....	27
Localización Física del Transposón....	30
Análisis del RNA mensajero para la Nitrogenasa de las Cepas MS-s.....	32
Análisis de la Organización Genómica de la Clona pSM204 en Varias Especies	

Nativas de <u>Rhizobium phaseoli</u>	32
Mutagénesis con Tn7 de la Cepa EM306...	34
Análisis de las Reiteraciones del Gene DifH en las Mutantes MS-s.....	36
DISCUSION.....	38
REFERENCIAS.....	45
AGRADECIMIENTOS.....	52

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno consiste en la reducción enzimática del nitrógeno molecular a amonio. En la naturaleza sólo un número muy limitado de microorganismos pueden llevar a cabo esta reacción. Las bacterias del género *Rhizobium*, residentes comunes del suelo, fijan nitrógeno al asociarse con las raíces de ciertas leguminosas. La organización de los genes que participan en la simbiosis, así como en la fijación de nitrógeno, está siendo ampliamente estudiada.

Uno de los organismos fijadores de nitrógeno mejor estudiado es *Klebsiella pneumoniae*. En éste sistema, los genes que participan en la reducción del nitrógeno molecular han sido ampliamente caracterizados. Los genes estructurales para la nitrogenasa están organizados en un sólo operón, el cual es regulado por los productos de los genes *nifL* y *nifA*, siendo el primero un activador y el segundo un represor de la transcripción. Para la expresión de los genes *nifL* y *nifA*, son necesarios los productos de los genes *glnF* y *glnG*, los que a su vez regulan la expresión de la glutamino sintetasa, por lo tanto, mutaciones en *glnF*, *glnG* o *nifA* causan la pérdida de la actividad de la nitrogenasa.

En éste trabajo se describe el aislamiento y la caracterización genética y fisiológica de varias mutantes de *Rhizobium phaseoli* sensibles a Metionina Sulfoximina. Estas cepas fueron obtenidas con el fin de estudiar la regulación genética de la fijación de nitrógeno, así como su posible relación con la regulación de la asimilación de amonio en éste organismo.

Las mutantes fueron aisladas, después de mutagenizar a la cepa silvestre CFN42 con Tn5, por su sensibilidad a MS. De la caracterización genética de estas mutantes se puede concluir que sólo tienen insertada una copia del transposón y que ésta es la causante del fenotipo. De acuerdo a su fenotipo, las mutantes pueden ser clasificadas en cuatro grupos: En el primer grupo se encuentran las cepas que no presentan ningún cambio en las actividades de GS ni en el fenotipo simbiótico (EM107); en el segundo grupo están representadas las cepas que perdieron la actividad de la GSII, pero que nodulan y fijan nitrógeno igual que la silvestre (EM203 y EM306); el tercer grupo no tiene alteradas las actividades de las GS, pero esta

cepa (EM204) produce nódulos que no fijan nitrógeno. Por último, la mutante del cuarto grupo (EM205), tiene alteradas las actividades de ambas GS, así como su capacidad de formar nódulos eficientes en fijación de nitrógeno.

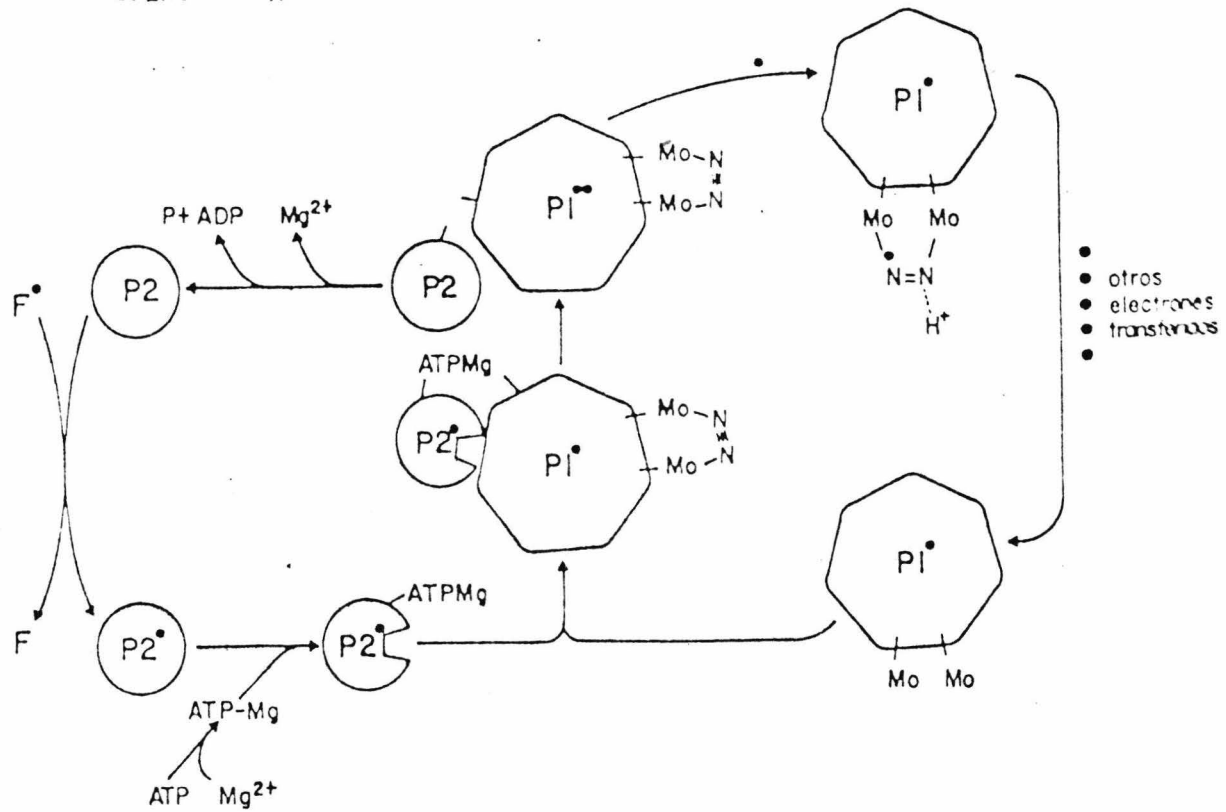
Del estudio de éstas mutantes se puede concluir que en R. phaseoli, existe un gene cuya función es capital en la regulación de la asimilación de amonio, así como para la simbiosis.

INTRODUCCION.

Todos los organismos vivos requieren asimilar del medio ambiente sustancias nitrogenadas para sintetizar sus componentes esenciales, estas sustancias pueden ser compuestos orgánicos, iones inorgánicos o nitrógeno molecular; en la naturaleza este elemento se encuentra principalmente en estado gaseoso, constituyendo aproximadamente el ochenta por ciento de la atmosfera terrestre, y sólo un número muy limitado de microorganismos pueden disponer del nitrógeno en su forma molecular; por tal motivo es de suma importancia su participación en el ecosistema, ya que son los responsables de la permanente canalización del nitrógeno atmosférico a compuestos orgánicos nitrogenados. Al proceso anterior se le conoce como fijación biológica de nitrógeno. Los microorganismos que llevan a cabo este proceso pueden hacerlo en vida libre o estar restringidos a reducir el nitrógeno atmosférico solamente cuando se encuentren interaccionando con otros organismos; por ejemplo: las bacterias del género *Rhizobium*, residentes comunes del suelo, reducen el nitrógeno molecular a amonio solamente cuando establecen una interacción con las raíces de ciertas leguminosas. Esta interacción, que requiere de un reconocimiento específico entre la planta y la bacteria, desencadena todo un programa de diferenciación simultáneo en ambos organismos, culminando con la formación de los nódulos maduros; estructuras en las cuales las bacterias, diferenciadas a bacteroides, fijan el nitrógeno atmosférico (Beringer *et al* 1979, Verma y Long 1983). Durante la simbiosis, los bacteroides exportan a la planta el amonio producido por la reducción del nitrógeno molecular, este compuesto es asimilado exclusivamente por la planta, puesto que *Rhizobium*, cuando se encuentra como bacteroide, tiene reprimidas las enzimas necesarias para tal efecto (Robertson *et al* 1975). Asimismo, la bacteria utiliza como fuente de carbono el fotosintato que obtiene del citoplasma de las células de la planta. En esta simbiosis, la bacteria aporta el nitrógeno necesario para el crecimiento de ambos organismos y, por otro lado, la planta contribuye con las moléculas indispensables para obtener la energía necesaria para fijar el nitrógeno atmosférico (Robertson y Fliedler 1980).

La nitrogenasa es la enzima que cataliza la conversión del nitrógeno molecular a amonio. Esta enzima está conformada por tres polipeptidos diferentes dispuestos en dos componentes: El componente denominado F1 es un tetrámero integrado por dos pares de polipeptidos distintos, para su

Figura 1: Mecanismo de Acción de la Nitrogenasa P1 (Componente 1) P2 (Componente 2) F (Donador de Electrones).



actividad requiere molibdeno y hierro como cofactores; el segundo componente (P2) es un dímero de subunidades idénticas que requiere hierro para su actividad. La estructura de esta enzima ha sido muy conservada en la evolución, tanto a nivel de la proteína, como en las secuencias del DNA que la codifican (Ruvkun y Ausubel 1980). El componente P1 cataliza la conversión del nitrógeno atmosférico a amonio hidrolizando de 12 a 15 moléculas de ATP por cada ion producido (Fig. 1). La subunidad P2 transfiere al componente P1 los electrones indispensables para lograr la reducción del nitrógeno molecular (Winter y Burtis 1976) (Fig. 1). La nitrogenasa es una enzima sumamente sensible al oxígeno; la presencia de éste elemento la inactiva de manera irreversible, por lo tanto, los organismos fijadores de nitrógeno se valen de distintas estrategias para protegerse de la oxidación, por ejemplo: las bacterias del género *Rhizobium*, aerobias estrictas, cuando se encuentran dentro de los nódulos en las raíces de las plantas, están protegidas de la oxidación por la leghemoglobina. Esta proteína une oxígeno con gran afinidad y lo libera de una manera dosificada para permitir la respiración de la bacteria, evitando de esta manera que la nitrogenasa sea inhibida por oxidación (Winttenberg et al 1974).

Regulación de la Fijación de Nitrógeno en Klebsiella pneumoniae.

Uno de los organismos fijadores de nitrógeno más estudiado es Klebsiella pneumoniae. Esta enterobacteria es capaz de reducir el nitrógeno molecular a amonio sin tener que establecer ninguna interacción simbiótica. La fijación de nitrógeno por este organismo sólo se lleva a cabo en determinadas condiciones de crecimiento, dependiendo de la tensión parcial de oxígeno así como de la concentración de compuestos nitrogenados en el medio (Tub y Postgate 1973, Eady et al 1978, MacNeil et al 1981). En este proceso están involucrados por lo menos diecisiete genes (nif), agrupados en siete u ocho unidades de transcripción adyacentes reguladas de manera similar (Kennedy et al 1980, Roberts y Brill 1981, Reynon et al 1983). Como se puede observar en la Figura 2, la expresión de los genes nif de K. pneumoniae está sujeta a un doble sistema regulatorio: un control transcripcional nif específico es ejercido por las proteínas codificadas por los genes del operón nifLA y, por otra parte, el segundo nivel de regulación se ejerce sobre la transcripción de éste operón. La transcripción del operón nifLA ocurre solamente en condiciones de limitación de compuestos nitrogenados (Ow y Ausubel 1983, Merrick 1983, Drummond et al 1983, Dixon et al 1984). El producto de nifA es un regulador positivo requerido para la expresión de todos los operones nif, excepto el propio (Dixon et al 1980, Buchanan-Wallaston et al

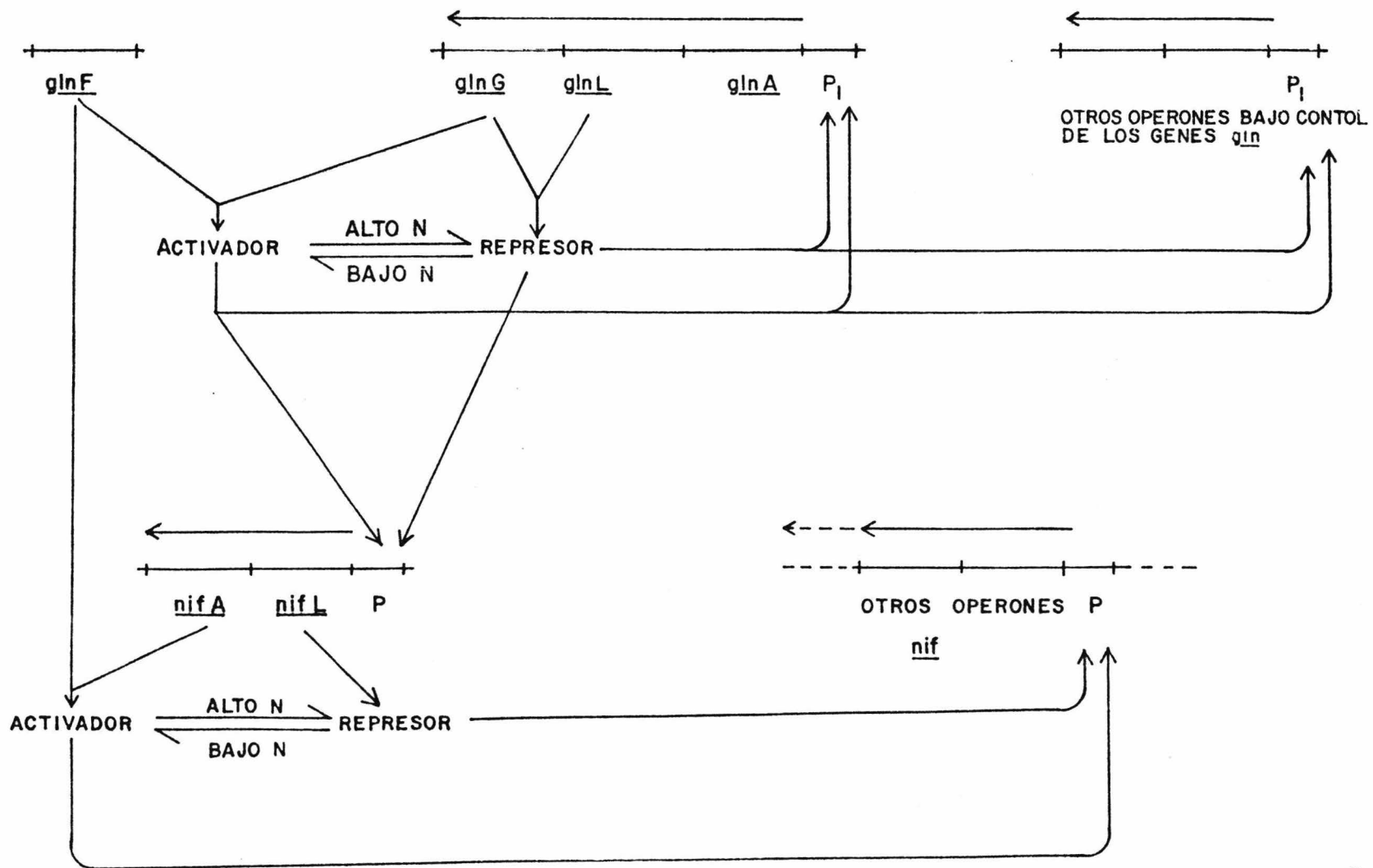


Figura 2 Modelo propuesto para el Contról Nitrogenado de la Expresión de los genes *nif* en *Klebsiella pneumoniae*. La transcripción de los genes *nif* se encuentra regulada a dos niveles: el primero lo ejercen las proteínas codificadas por los genes *nifA* y *nifL*, y el segundo es el controlado por los productos de los genes *gln*, los cuales ejercen un control generalizado de la expresión de los operones regulados por la fuente de nitrógeno (Merrick 1983).

1981a), mientras que nifL, al parecer antagoniza la acción del producto de nifA en respuesta al incremento en la tensión parcial de oxígeno o bien, al aumentar las pozas internas de compuestos nitrogenados (Buchanan-Wollaston et al 1981b, 1984, Hill et al 1981, Merick et al 1982). La expresión de los genes de este operón está mediada por un sistema de regulación generalizado, el cual controla la expresión de una gran variedad de enzimas involucrados en la asimilación de diversos compuestos nitrogenados (ver a continuación).

A los sistemas genéticos regulados por la fuente de nitrógeno se les ha denominado "sistemas Ntr" (Magasanik 1982); como ejemplos de estos sistemas pueden mencionarse: los operones para el catabolismo de varios aminoácidos (arginina, prolina, histidina, etc.), los genes involucrados en el transporte de estos mismos compuestos, así como el operón que contiene al gene estructural para la glutamino sintetasa (GS). La regulación de éstos sistemas se lleva a cabo por los productos de los genes glnF, glnG y posiblemente glnL. La proteína codificada por glnG actúa como represor de la transcripción de los operones sujetos a control nitrogenado (McFarland et al 1981) y, por otro lado, los productos codificados por glnF y glnG activan la transcripción de éstos mismos operones (McFarland et al 1981). Hasta el momento no es claro el papel de glnL, dado que son muy variados los fenotipos de las diferentes mutantes en este gene. Los genes glnL y glnG forman parte del operón que contiene al gene estructural de la GS (glnALG) (Pahel et al 1982), la transcripción de éste operón va de glnA a glnG, por tal motivo, algunas mutaciones en el gene estructural de la GS son polares a glnG y, por lo tanto, son incapaces de crecer utilizando algunos aminoácidos como fuentes únicas de nitrógeno (fenotipo Ntr) (Guterman et al 1982). El gene glnF no está ligado a los genes anteriores, en el genoma de las enterobacterias se encuentran separados por 18 minutos aproximadamente (García et al 1977, Gaillardin y Magasanik 1978, Pahel et al 1979). Los sistemas Ntr han sido descritos en varios organismos, entre ellos, E. coli (Pahel 1982, MacNeil et al 1982), S. typhimurium (Kustu et al 1979, McFarland et al 1981) y K. pneumoniae (Espín et al 1981, 1982).

Los genes de K. pneumoniae involucrados en la fijación de nitrógeno pueden considerarse como un sistema Ntr, puesto que se requiere de los productos de glnG (Espín et al 1981, 1982, de Bruijn y Ausubel 1981), así como glnF (Leonardo y Goldberg 1980, de Bruijn y Ausubel 1983) para la expresión de los genes reguladores de la nitrogenasa (Fig. 2). Por otra parte, para la activación de los genes estructurales de la nitrogenasa por nifA se requiere de glnF, ya que mutantes glnF⁻, no expresan los genes de la nitrogenasa, aún y cuando nifA está siendo sintetizado constitutivamente. En conclusión, glnF es necesario en los dos niveles de regulación transcripcional de

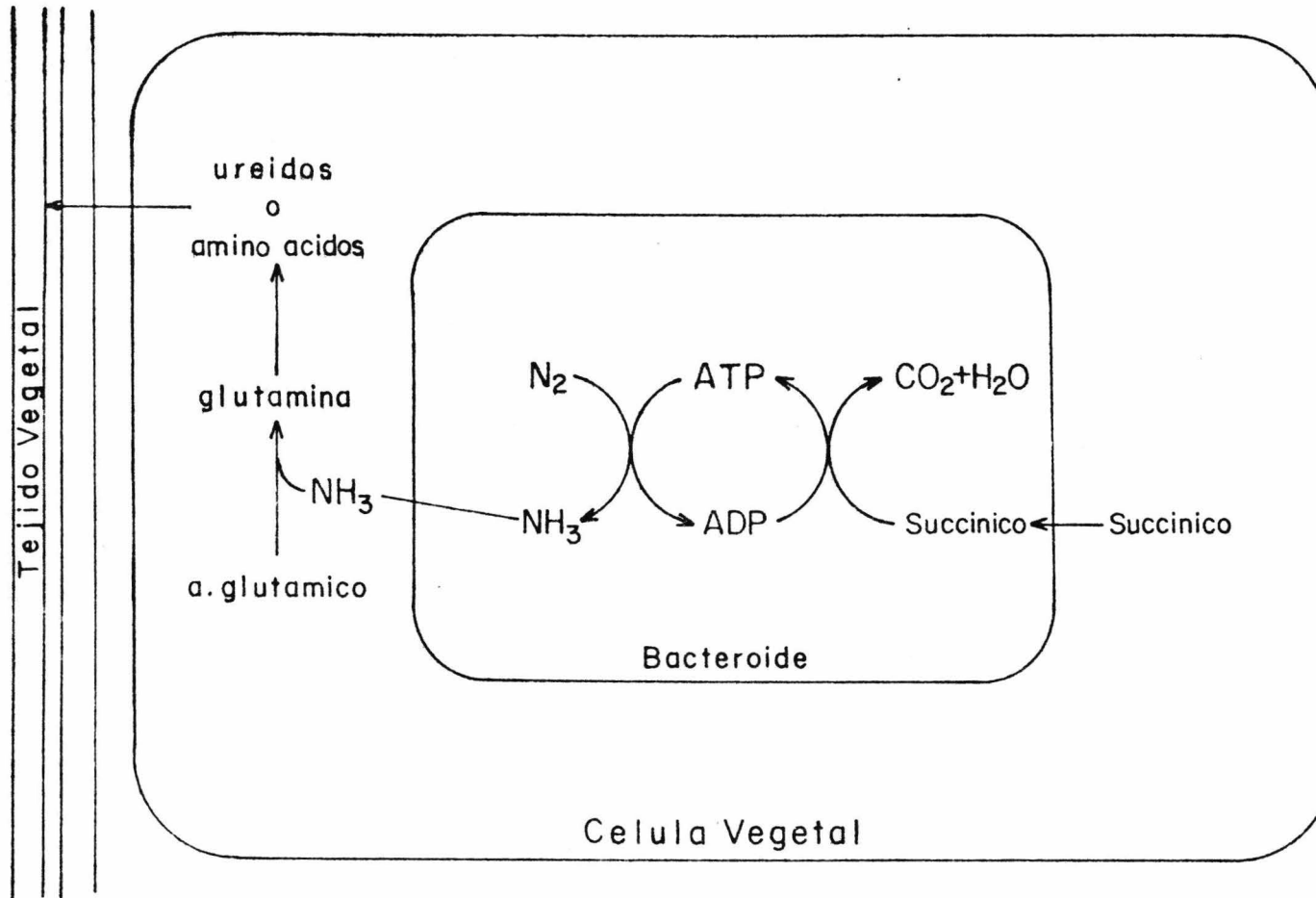


Figura 3 Asimilación de Amonio en el Nódulo. El bacteroide se establece en el citoplasma de la célula vegetal, reduce el nitrógeno molecular a amonio y lo excreta para que sea asimilado por las enzimas de la planta.

los genes involucrados en la fijación de nitrógeno (Fig. 2).

Estos resultados sugieren que el mecanismo de activación por los productos de *nifA* y *glnG* pueden ser similares, puesto que ambos necesitan de una proteína funcional *glnF* para promover la transcripción de los operones bajo su control. Considerando éstos resultados, se han efectuado experimentos para estudiar si en *K. pneumoniae* *glnG* puede sustituir a *nifA* en sus funciones y viceversa. Recientemente se ha encontrado que al expresarse *nifA* constitutivamente en una cepa *glnG*⁻, el producto codificado por *nifA* puede activar la transcripción de su propio promotor, (Drummond *et al* 1983) así como la transcripción de los operones normalmente regulados por *glnG*, por ejemplo: los genes para la utilización de arginina, prolina e histidina (Merrick, 1983, Ow y Ausubel 1983). Si bien, al expresar el gene *nifA* constitutivamente puede substituir a *glnG* en sus funciones, el clonar *glnG* y sobreproducir su producto en una cepa *nifA*⁻, no activa la transcripción del operón que codifica para las proteínas estructurales de la nitrogenasa.

La similitud de los genes *glnG* y *nifA* va mas allá de lo funcional. Estos genes codifican para proteínas básicas con un pI muy semejante y su peso molecular es prácticamente igual (55,000d) (Backman *et al* 1982, Ausubel y Cannon 1981). La semejanza de estos polipeptidos, así como la similitud de los operones en los que se encuentran (en ambos están juntos un represor y un activador) ha llevado a dos grupos independientes a postular que el operón *nifLA* evolucionó directamente de una unidad de transcripción *glnLG* ancestral, posiblemente por una duplicación cromosomal, ya que se encuentran diametralmente opuestos en el cromosoma de *K. pneumoniae* (Merrick 1983, Ow y Ausubel 1983). El origen de varios genes de *E. coli* ha sido propuesto por Riley y Anilionis (1978) por un mecanismo similar al anterior.

Regulación de la Fijación de Nitrógeno en Bacterias del Genero *Rhizobium*.

En contraste con *K. pneumoniae*, la regulación de la expresión de los genes *nif* en bacterias del género *Rhizobium*, ha sido poco estudiada. Los genes que codifican para las proteínas estructurales de la nitrogenasa de varios de estos organismos, entre ellos *R. phaseoli* (Quinto *et al* 1982), han sido clonados y caracterizados (Ruvkun y Ausubel 1980). Estos genes fueron recuperados de librerías genómicas utilizando como detectores de hibridización a los genes análogos de *K. pneumoniae*, ya que las secuencias que codifican para la nitrogenasa se encuentran altamente conservadas (Ruvkun y Ausubel 1980). En todos los *Rhizobium* de

crecimiento rápido. hasta ahora estudiados los genes estructurales de la nitrogenasa están organizados, al igual que en *Klebsiella*, en un sólo operón *nifHDK*. Asimismo, el promotor de este operón de *R. meliloti* tienen homología con las secuencias 5' de los operones *nif* de *K. pneumoniae* (Ow, et al 1983, Beynon et al 1983), esta homología consiste en una secuencia consenso heptamérica localizada muy cerca del inicio de la transcripción. El gene *nifH* de *R. meliloti* puede ser activado por *nifA* de *K. pneumoniae* cuando éste último se expresa a partir de un promotor constitutivo en un plásmido multicopia (Sundaresan, et al 1983). Estos resultados sugieren que para la transcripción de los genes *nif* de *R. meliloti* es necesaria la participación de un gene análogo a *nifA*.

En *R. meliloti* y en *R. leguminosarum* han sido descritos algunos mutantes incapaces de fijar nitrógeno que mapean cerca de los genes estructurales de la nitrogenasa. Estas mutantes se encuentran en un gene con homología a *nifA* de *K. pneumoniae* (Zimmerman et al 1983, Szeto et al 1984, Downie et al 1983). En los nódulos formados por la infección con las cepas que llevan estas mutaciones, no se logran detectar los polipéptidos de la nitrogenasa, ni RNA mensajero para su síntesis; a estas mutantes se les ha denominado *nifA* "like", ya que presentan fenotipo similar a las mutantes *nifA* de *K. pneumoniae*, así como por la homología existente con este gene. A diferencia de *K. pneumoniae*, se desconoce el mecanismo por el cual este gene es regulado.

Estos resultados sugieren que la regulación de la fijación de nitrógeno en los Rhizobiae puede tener características en común con la regulación de esta función en *K. pneumoniae*, a pesar de que estos organismos tienen entre sí considerables diferencias fisiológicas, por ejemplo: la nitrogenasa de los Rhizobiae es menos sensible a represión por amonio que la enzima de *K. pneumoniae* (Shanmugam y Morandi 1976, Ludwig, 1980a), asimismo, en este último organismo, los genes *nif* se encuentran en el cromosoma, mientras que en *Rhizobium*, estos mismos genes se localizan en plásmidos de alto peso molecular (Nuti et al 1979; por otra parte, el amonio producido por la reducción del nitrógeno molecular en *K. pneumoniae* es asimilado por su GS, mientras que la asimilación del nitrógeno fijado en los nódulos la lleva a cabo la GS de la planta (Fig. 3); la actividad de esta enzima en los bacteroides es muy baja.

Las bacterias del género *Rhizobium*, así como *Agrobacterium* poseen dos proteínas diferentes con actividad de glutamino sintetasa (Darrow et al 1977, Fuchs y Keister 1980a, 1980b). Estas enzimas pueden ser separadas por enfoque isoeléctrico o por su diferencia de sedimentación en gradientes de sacarosa (Darrow 1980). La GSI es muy similar a la glutamino sintetasa de las enterobacterias, las subunidades de

esta enzima tiene un peso molecular aproximado de 59,000 daltons, en su forma activa se encuentra asociada en un dodecámero, es termoestable y esta sujeta a regulación por adenilación, de manera similar a la GS de E. coli (Darrow 1980). La GSII tiene un peso molecular menor, 36,000 daltons aproximadamente, se desconoce su estado oligomérico, no es regulada por adenilación y es más sensible a la temperatura que la GSI. El origen de estas proteínas parece no ser el mismo, ya que al analizar digestiones proteolíticas de ambas, se observan patrones peptídicos diferentes (Darrow 1980).

Como se mencionó previamente, la regulación de la fijación de nitrógeno en Rhizobium puede tener características similares a la regulación de esta función en K. pneumoniae. Otra evidencia que apoya esta suposición esta basada en los trabajos de dos grupos: Ludwig y Signer en Rhizobium Spp (1977) y Kondorosi et al. en R. meliloti (1977). Ambos grupos han aislado mutantes auxotrofos de glutamina que, al igual que algunos auxotrofos de este aminoácido en K. pneumoniae, pierden la actividad de la nitrogenasa. Lo mutante de Rhizobium Spp requiere glutamina para su crecimiento y es incapaz de fijar nitrógeno, tanto en simbiosis como en vida libre (éste organismo puede reducir el nitrógeno en vida libre bajo ciertas condiciones, y sólo cuando se encuentra en la fase estacionaria de crecimiento (Pagan et al 1975)). En un trabajo posterior, se encontró que esta mutante había perdido la actividad de la GSII y la GSI se encontraba invariablemente adenilada. Al analizar revertantes a prototrofia por glutamina se encontraron dos tipos: unas cepas que recuperaban la actividad de la GSII pero no la capacidad de fijar nitrógeno, y las otras revertantes seguían sin actividad de GSII pero la GSI se encontraba en su forma desadenilada, aún y cuando fuera crecida en exceso de amonio; estas últimas cepas recobraban la capacidad de producir nitrogenasa (Ludwig 1980). La mutante de R. meliloti, aislada como derivada de una auxotrofo de histidina que puede crecer utilizando D-histidina (ver a continuación), forma nódulos pequeños de color blanco sin actividad de nitrogenasa y, al aislar revertantes a prototrofia por glutamina, se recupera la capacidad para fijar nitrógeno (Kondorosi et al 1977).

Las mutantes reportadas por ambos grupos no fueron analizadas genéticamente, por lo tanto no se sabe si el fenotipo esta ocasionado por una o varias mutaciones.

Estudio de la Regulación Genética de la Fijación de Nitrógeno en R. phaseoli.

El estudio de la simbiosis entre R. phaseoli y Phaseolus

vulgaris (frijol común), es de trascendental importancia en México, puesto que el frijol es la principal fuente de proteínas para un alto porcentaje de la población. A pesar de que la disposición de nitrógeno no es la mayor limitante para la producción de esta leguminosa (Martínez 1983), el conocer en detalle esta simbiosis, así como los mecanismos moleculares que la conforman, podría permitir la manipulación de la información genética para intentar obtener organismos más productivos. Asimismo, el proceso de la reducción del nitrógeno atmosférico es un campo de la biología molecular que aún tiene grandes interrogantes, sobre todo en aquellos organismos que requieren de alguna asociación simbiótica para poder fijar nitrógeno. El caso de R. phaseoli es de especial interés, puesto que en éste organismo los genes estructurales para la nitrogenasa se encuentran en varias copias y aún se desconoce el significado de estas reiteraciones (Quinto et al 1982).

En éste trabajo se pretende determinar si existen elementos comunes en la regulación genética de las enzimas responsables de la asimilación de amonio y de la fijación de nitrógeno en R. phaseoli. Los resultados obtenidos en este campo en otros miembros del género *Rhizobium*, son ambiguos y requieren de una interpretación cautelosa. Sin embargo, como se mencionó previamente, estos resultados sugieren que la regulación de ambas funciones puede estar mediado por un sistema común, que posiblemente se asemeje a lo reportado para K. pneumoniae.

Para estudiar la regulación genética de cualquier sistema, es indispensable contar con mutantes que tengan alterada la función que se pretende conocer. Por tal motivo, es necesario disponer de mutantes de R. phaseoli en la fijación de nitrógeno o en la asimilación de amonio para poder determinar si existe regulación común para ambas funciones. La obtención de cepas con mutaciones que originen alguna alteración en la actividad de la nitrogenasa en éste organismo no es fácil, ya que no ha sido desarrollado ningún método eficiente para su selección. Asimismo, la obtención de mutantes en el proceso de la reducción del nitrógeno molecular puede presentar serios problemas en R. phaseoli, ya que en este organismo la información genética puede estar reiterada, por ejemplo, se ha encontrado que de los genes nif al menos los estructurales, así como otras clonas de las que se desconoce su función, se encuentran en varias copias en el genoma de éste organismo (Quinto et al 1982, Sánchez et al 1984). Por otra parte, ya han sido aisladas mutantes al azar en la fijación de nitrógeno en éste laboratorio (Noel et al 1984). La selección de mutantes en la asimilación de amonio en R. phaseoli presenta ciertas complicaciones, ya que este organismo tiene dos proteínas con actividad de GS, por lo tanto, la probabilidad de obtener auxótrofos de glutamina es muy baja. Sin embargo, una estrategia a seguir para la

obtención de mutantes en la asimilación de amonio, consiste en la selección de cepas con menor actividad de alguna o ambas GS, que podrían obtenerse mediante la selección de mutantes sensibles a algún compuesto que inhiba la actividad de los GS. La L-Metionina D-L-Sulfoximina (MS), que es análogo al ácido glutámico, se une de manera irreversible a la GS causando la pérdida de su actividad. La sensibilidad a MS puede ser producto de una serie de factores, entre ellos, la pérdida o disminución de la actividad de las glutamino sintetas. Por otra parte, las mutaciones *glnG*⁻ de *E. coli* causan sensibilidad a MS (Osorio *et al* 1984). Si existe un gene con funciones equivalentes a *glnG* de las enterobacterias en *R. phaseoli*, mutaciones en este gene podrían ser detectadas como sensibles a MS.

Otra manera de buscar mutantes del tipo anterior, sería mediante la selección de cepas de *R. phaseoli* auxótrofas de histidina que puedan suplir su requerimiento con el isómero D de este compuesto, como lo reportado para *S. typhimurium* (Kustu y McKereghan 1975). La racemasa de histidina es reprimida por glutamina, por lo tanto, las mutantes con menor actividad de GS pueden emplear D-histidina para sustituir su auxotrofia por dicho aminoácido, ya que en estas cepas los pozos de glutamina se deben de encontrar muy bajas y, por lo tanto, activa la racemasa de histidina. Por otra parte, utilizando los detectores convenientes, se podría determinar si en *R. phaseoli* existe homología con los genes *gln*; estos detectores podrían ser los plásmidos que llevan los genes *glnL* y *glnG* o *glnF* de *E. coli* o de *K. pneumoniae*. Si se encuentra homología, se recuperarían estos genes para mutagenizarlos.

El método de selección de los mutantes elegido para este trabajo fue el de sensibilidad a MS, ya que de esta manera se pueden obtener mutantes por selección del fenotipo en placa y no se requiere de ninguna otra cepa de *R. phaseoli* aparte de la silvestre.

De existir regulación común entre la asimilación de amonio y la fijación de nitrógeno, las cepas con alteraciones en la actividad de cualquiera de las GS, podrían tener afectada la actividad de la nitrogenasa. En el presente trabajo se describe la obtención y caracterización genética y fisiológica de mutantes sensibles a MS, derivados de la cepa silvestre de *R. phaseoli* CFN42. En algunas de estas mutantes la fijación de nitrógeno fue afectado. Del estudio de estas cepas se puede concluir que por lo menos existe un gene cuyo producto es indispensable para la actividad óptimo de ambas GS, así como para el desarrollo normal de los nódulos y, por lo tanto, para la fijación de nitrógeno.

METODOLOGIA

CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS. Todas las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo, se presentan en las Tablas 1 y 2.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO. El medio de cultivo rico utilizado para crecer R. phaseoli fue PY (peptona de caseína 0.5%, extracto de levadura 0.3% y CaCl_2 7mM). El medio mínimo empleado fue MM (FeCl_3 22mg/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100mg/l, K_2HPO_4 220mg/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 220mg/l, suplementado con succinato de sodio 1350mg/l y glutamato de sodio 1100mg/l, pH 7.0) (Noel et al 1984). El medio rico para crecer E. coli fue LB (peptona de caseína 1.0%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1.0%). Para solidificar los medios se empleo agar al 1.5%. Cuando se requirió, se utilizaron los siguientes antibioticos para R. phaseoli: Estreptomicina (Str) 200ug/ml, Kanamicina (Kan) 60ug/ml, Rifampicina (Rif) 25ug/ml, Cloramfenicol (Cm) 10ug/ml, Tetraciclina (Tc) 10ug/ml, Acido Nalidixico (Nal) 20ug/ml y Espectinomocina (Sp) 100ug/ml. La temperatura de crecimiento para R. phaseoli fue de 30°C y para E. coli 37°C. Los cultivos en medio líquido fueron agitados a 200rpm, los cultivos en medio sólido se mantuvieron en incubadora hasta obtener colonias aisladas (3 días aproximadamente).

Las conjugaciones bacterianas se realizaron sobre PY sólido, procurando poner el mismo número de células receptoras y donadoras. Después de 16h, las bacterias fueron resuspendidas en 1ml de solución salina fosfatos (NaCl 8.5g/l, K_2HPO_4 7.0g/l, KH_2PO_4 3.0g/l, pH 7.2) y plateadas sobre el medio selectivo.

MUTAGENESIS CON TRANSPOSON Y SELECCION DE LAS CEPAS MS SENSIBLES. Para la obtención de mutantes por inserción de transposon en el genoma de R. phaseoli, se utilizó el procedimiento del "plásmido suicida" (Fig. 4). Dicho método consiste en introducir por conjugación a éste organismo un plásmido que sea incapaz de replicarse en Rhizobium y que lleve insertado algún transposon. El plásmido que se utilizó en este trabajo para seleccionar las mutantes sensibles a MS fue el pSUP1011 (derivado de pBR325 con $\text{In}5$ al cual se le clono el sitio oriT del plásmido RP4 para poder ser movilizado) (Simon et al 1983). Para movilizar éste plásmido a la cepa silvestre de R. phaseoli, se llevo a cabo una cruz

TABLA I. CEPAS UTILIZADAS Y CONSTRUIDAS PARA ESTE TRABAJO

CEPA	CARACTERISTICAS PRINCIPALES	REFERENCIAS
<u>Rhizobium phaseoli</u>		
CFN42	Silvestre (Aislamiento de Campo)	Quinto <u>et al</u> (1982)
CFN1	Silvestre (Aislamiento de Campo)	Palacios <u>et al</u> no publicado
CFN3	Silvestre (Aislamiento de Campo)	Palacios <u>et al</u> no publicado
CFN44	Silvestre (Aislamiento de Campo)	Palacios <u>et al</u> no publicado
CFN88	Silvestre (Aislamiento de Campo)	Palacios <u>et al</u> no publicado
CIAT281	Silvestre (Aislamiento de Campo)	Soberón (1983)
NITRAGIN8251	Silvestre (Aislamiento de Campo)	Quinto <u>et al</u> (1982)
EM107	Derivada Kan ^r (Tn5) de la Cepa CE3	Este trabajo
EM203	Derivada Kan ^r (Tn5) de la Cepa CE3	Este trabajo
EM204	Derivada Kan ^r (Tn5) de la Cepa CE3	Este trabajo
EM205	Derivada Kan ^r (Tn5) de la Cepa CE3	Este trabajo
EM306	Derivada Kan ^r (Tn5) de la Cepa CE3	Este trabajo
EM1107	Transconjugante Kan ^r de la Cepa CE2 después de cruzarla por la Cepa EM 107 pJB3	Este trabajo
EM1203	Transconjugante Kan ^r de la Cepa CE2 después de cruzarla por la Cepa EM 203 pJB3	Este trabajo
EM1204	Transconjugante Kan ^r de la Cepa CE2 después de cruzarla por la Cepa EM 204 pJB3	Este trabajo
EM1205	Transconjugante Kan ^r de la Cepa CE2 después de cruzarla por la Cepa EM 205 pJB3	Este trabajo
EM1306	Transconjugante Kan ^r de la Cepa CE2 después de cruzarla por la Cepa EM 306 pJB3	Este trabajo
CFN2025	Derivada de la Cepa EM204 curada del plásmido p42d (Sim)	Este trabajo
CFN2001	Derivada de la Cepa CFN42 curada del plásmido p42d (Sim)	Quinto <u>et al</u> (1982)
GE2	Derivada Kan ^r (Tn5) de la Cepa CE3	Espín <u>et al</u> (1984)
CE2	Derivada Rif ^r , Cm ^r de la Cepa CFN42	Noel <u>et al</u> (1984)
CE3	Derivada Rif ^r de la Cepa CFN42	Noel <u>et al</u> (1984)
<u>Escherichia coli</u>		
HB101	<u>recA</u> <u>hsdR</u> <u>hsdM</u> <u>pro</u> <u>leu</u> <u>SirA</u> <u>EndoI</u> <u>thi</u> <u>lacY</u>	Eoyer <u>et al</u> (1983)
MX848	<u>l'pro-lac</u> <u>galE</u> <u>plrf73::Tn5</u> <u>thi1</u> <u>ilv680</u>	Osorio <u>et al</u> (1984)
PR1	Derivada <u>recA</u> [*] de la Cepa HB101	
GV1000	<u>thr</u> <u>leu</u> <u>thi</u> Rif ^r	Hernalsteens <u>et al</u> (1978)

TABLA II. PLASMIDOS UTILIZADOS Y CONSTRUIDOS PARA ESTE TRABAJO

PLASMIDO	CARACTERISTICAS PRINCIPALES	REFERENCIAS
pJB3	Derivado Kan ^S de R68.45 <u>IncPY</u> Cm ^r Amp ^r	Brewin <u>et al</u> (1980)
pBR322:: <u>Tn5</u>	Inserción <u>in vivo</u> de <u>Tn5</u> en pBR322	Espín <u>et al</u> (1984)
pGE2	Derivado de pBR329 con el fragmento <u>EcoR1</u> con <u>Tn5</u> de la Cepa CFN2018	Espín <u>et al</u> (1984)
pSM7	Derivado de pBR329 con el fragmento <u>EcoR1</u> sin el <u>Tn5</u> del pGE2	Espín <u>et al</u> (1984)
pSM204	Derivado de pBR329 con el fragmento <u>EcoR1</u> con el <u>Tn5</u> de la Cepa EM204	Este trabajo
pSUP207	Derivado Sp ^r (<u>Tn7</u>) de pBR325 con el sitio <u>mob</u> de RP4	Leemans no publicado
pSUP1011	Derivado Kan ^r (<u>Tn5</u>) de pBR325 con el sitio <u>mob</u> de RP4	Simon <u>et al</u> (1983)
pRK2013	Derivado de ColE1 con la región <u>tra</u> de RK2	Guiney <u>et al</u> (1979)

triparental en la cual se empleo al plásmido pRK2013, contenido en la cepa HB101, como "plásmido ayudador". Este último plásmido es un derivado del RP4 que se requiere para que el pSUP1011 pueda ser movilizado. Al cabo de 16h, las bacterias se platearon sobre medio selectivo (FY Kan, Str, Nal), las colonias resultantes se replicaron a medio mínimo, MM MS 5ug/ml y MM MS 10 ug/ml. Las colonias que presentaron un menor crecimiento en presencia de MS, fueron recuperadas y purificadas extensivamente. Para la selección de auxótrofos de glutamina se empleo al plasmido pSUP207, este plásmido es un derivado movilizable de pBR325 con Tn7. Para la movilización del pSUP207 a la cepa EM306 se utilizó al plásmido pRK2013. Después de 16h, las transconjugantes Sp-r fueron replicadas a MM, MM+gln, FY, FY+gln, todos estos medios contenían Sp 100ug/ml, Kan 60ug/ml.

DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA GLUTAMINA SINTETASA. Las actividades de las GS se determinaron por el método de "transferasa" (Bender et al 1977). Se colectaron por centrifugación 50 ml de un cultivo en MM+gln, la pastilla se lavó dos veces con solución de extracción (imidazol 10mM, NaCl 1.0mM, pH 7.0) y se determinaron las actividades de GS en células totales permeabilizadas, o en extractos crudos obtenidos por sonicación. Las actividades de la GSI y la GSII se pudieron distinguir por la diferencia en sensibilidad a la temperatura o por su distinta migración en gradientes de sacarosa (Darrow 1980).

SEPARACION DE GSI Y GSII EN GRADIENTES DE SACAROSA. Para poder diferenciar la actividad de las dos GS de Rhizobium, estas fueron separadas por centrifugación en gradientes continuos de sacarosa (5-20% en solución de extracción). Se tomaron 400ug de proteína de un extracto celular y fueron colocados en la parte superior del gradiente, el cual fue hecho en tubos de nitrocelulosa de 5ml, y se centrifugo por 3h a 36,000rpm. Concluida la centrifugación, se colectaron aproximadamente 20 alícuotas de 300ul a las que les fue determinada la actividad de GS.

DETERMINACION DEL PATRON DE PLASMIDOS DE R. phaseoli. Con el objeto de examinar el perfil electroforético de los diferentes plásmidos de Rhizobium, se corrieron geles de agarosa al 0.7% de acuerdo al método de Eckhardt (1978). Concluida la electroforesis, el DNA fue teñido con una solución de 5ug/ml de bromuro de etidio para visualizar los plásmidos al iluminarlos con UV.

PURIFICACION DE DNA Y CONDICIONES DE DIGESTION. Para la purificación de DNA total se cosecharon 1.5ml de un cultivo

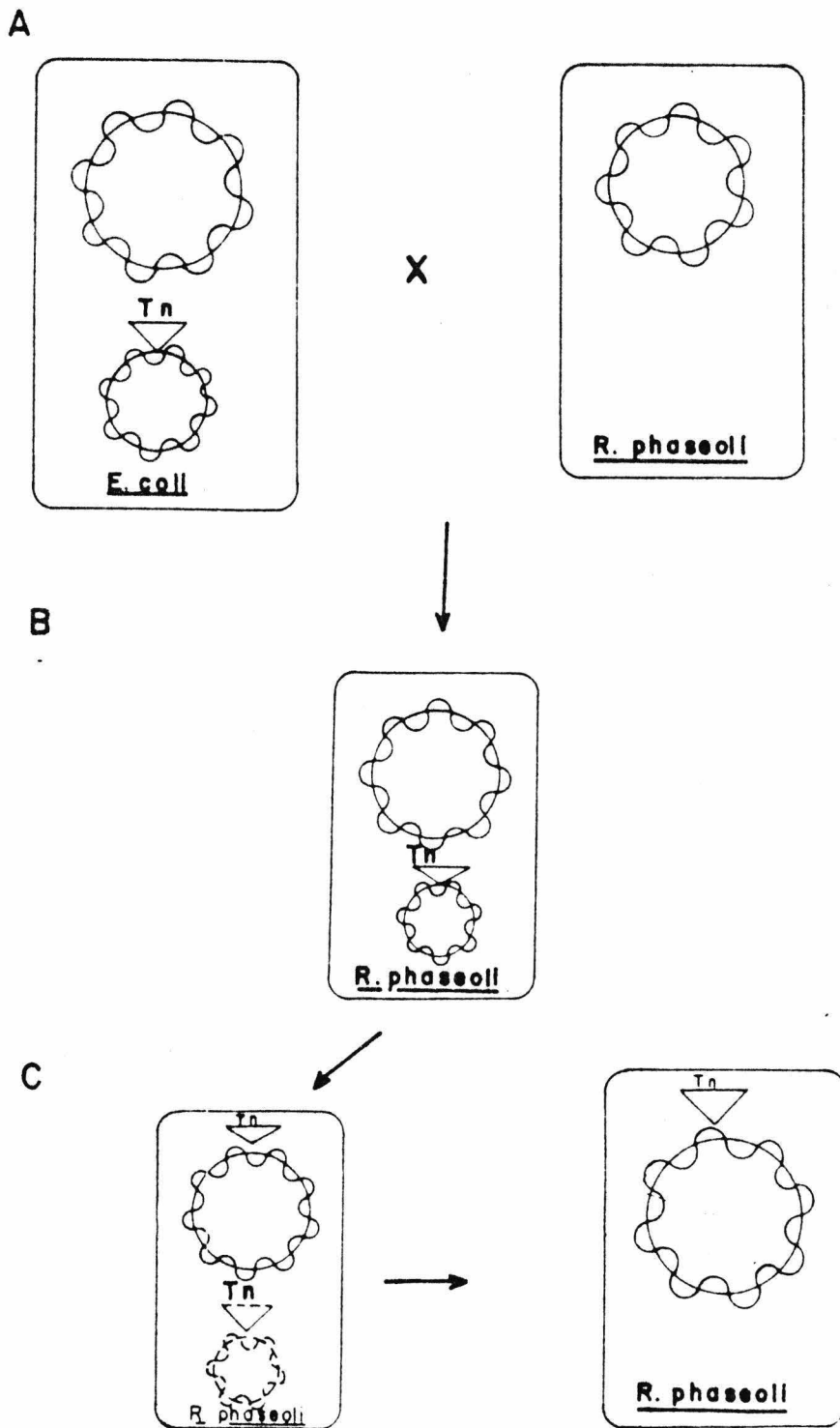


Figura 4 Mutagenesis con Transposones en *Rhizobium phaseoli*. Los plásmidos con el transposón que se requiera utilizar, son movilizados a la cepa silvestre (A). Es indispensable que el plásmido sea incapaz de replicarse en *R. phaseoli*, por lo que permanecerá sólo una generación (B), al seleccionar el marcador del transposón se obtienen las transconjugantes con las inserciones de este elemento en el genoma.

líquido de R. phaseoli por centrifugación, las células fueron lisadas al agregar 100ul de Sarkosyl al 5% en TE (Tris 50 mM, EDTA 20mM pH 8) y 100ul de pronasa a una concentración de 2.5mg/ml e incubadas a 37°C por una hora, el lisado se pasó por una jeringa para reducir la viscosidad, se extrajo dos veces con fénol equilibrado en TE y cloroformo y se precipitó el DNA al añadir NaCl para una concentración final de 0.25M y dos volúmenes de etanol. Después de 12h a -20°C, se centrifugó 5min a 4°C, la pastilla se secó por evaporación y se resuspendió en agua esteril y filtrada. Las condiciones de digestión fueron las mismas que las reportadas por Quinto et al (1982).

CONDICIONES DE HIBRIDIZACION. Para los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, se transfirió el DNA del gel a membranas de nitrocelulosa, de manera similar a lo reportado por Southern (1975). Las hibridaciones con detectores homólogos fueron efectuadas en condiciones de baja estringencia iónica a 65°C. Asimismo, los experimentos con detectores heterólogos se llevaron a cabo en alta estringencia iónica (en formamida al 50%) a 42°C. Los plásmidos utilizados como detectores fueron previamente marcados con 32P por el procedimiento de "nick translation" (Rigby et al 1977).

DETERMINACION DE LA FIJACION DE NITROGENO Y DE LA NODULACION. Para todos los ensayos de nodulación con R. phaseoli, se utilizaron semillas de frijol Cv. "negro jamapa". Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 2.0%, se pregerminaron por espacio de tres días en la oscuridad a 30°C dentro de matroces Erlenmeyer de 250ml, conteniendo 100ml de solución salina libre de nitrógeno (Wacek y Brill 1976) solidificada con agar al 0.8%. Una vez germinadas las plantas, se inocularon con 1ml de un cultivo saturado de las cepas a analizar.

La actividad enzimática de la nitrogenasa fue determinada en los nódulos adheridos a las raíces de las plantas. A los 12, 18 y 21 días después de haber germinado, las raíces se cortaron y se introdujeron en frascos de 10ml con tapón de hule hermético, a dichos frascos se les inyectaron 0.5ml de acetileno y se dejó correr la reacción por 1h, dado que la nitrogenasa reduce este compuesto a etileno, la actividad de esta enzima fue determinado midiendo la producción de etileno por cromatografía de gases.

AISLAMIENTO DE RNA DE R. phaseoli. El RNA fue aislado mediante la siguiente estrategia: Se colectaron por centrifugación 3ml de un cultivo líquido en la fase estacionaria de crecimiento, las células fueron resuspendidas en 1ml de TE con 0.1% de Dietilpirocabonato (DEPC) y lavados

2 veces por centrifugación. La pastilla celular fue resuspendida en Sarkosyl al 0.1% en TE-DEPC, centrifugado inmediatamente y lavada con TE-DEPC. Para terminar con la lisis, se agregaron 500ul de Lisozima 2mg/ml y se incubo 10min a temp. ambiente. Transcurrida la incubación, el extracto fue centrifugado y el sobrenadante extraído 2 veces con Fenol-Cloroformo-Isoamilico (24-24-1). Como control, una alícuota fue separada e incubada con RNAasa a una concentración final de 10ug/ml durante 1h a 37°C. Al control y a la prueba, se les adicionó SSC y Formaldehido, se calentaron a 60°C por 15min y se filtraron sobre membranas de nitrocelulosa para su posterior hibridización.

DETERMINACION DE PROTEINA. Para calcular las actividades específicas de las GS, así como el volumen para los gradientes, fueron determinadas las concentraciones de proteína de acuerdo al método de Lowry et al (1951).

RESULTADOS

En éste trabajo se describe el estudio genético y fisiológico de mutantes de R. phaseoli sensibles a MS. Estas mutantes fueron obtenidas con el fin de estudiar la regulación genética de la fijación de nitrógeno en este organismo. Los resultados obtenidos hasta el momento por varios grupos de investigación, sugieren que la regulación transcripcional de los genes que participan en la asimilación de amonio y en la fijación de nitrógeno en Rhizobium, puede estar mediada por un sistema común, análogo al reportado para K. pneumoniae.

Para estudiar si en R. phaseoli existe regulación común para ambas funciones, es necesaria la obtención y el análisis de mutaciones que afecten la asimilación de amonio o la fijación de nitrógeno. La obtención de mutaciones que originen alguna alteración en la actividad de la nitrogenasa en éste organismo no es fácil, ya que no ha sido desarrollado ningún método eficiente para su selección. El fenotipo de fijación de nitrógeno (Fix) sólo es posible determinarlo en los nódulos, por lo tanto, para aislar este tipo de cepas se requiere inocular un gran número de plantas con las posibles mutantes y su análisis es muy laborioso. Por tal motivo, se decidió obtener mutantes en la asimilación de amonio, principalmente en la síntesis de glutamina.

Las bacterias del género Rhizobium, poseen dos proteínas diferentes que pueden catalizar la conversión del ácido glutámico a glutamina (ver introducción), por lo tanto, la probabilidad de seleccionar auxótrofos de éste aminoácido es muy baja. Sin embargo, es posible obtener mutantes con menor actividad que la cepa silvestre, seleccionando colonias sensibles a algún compuesto que inhiba la actividad de estas enzimas.

Aislamiento de Mutantes Sensibles a MS.

La Metionina Sulfoximina (MS) es un análogo del ácido glutámico que inhibe específicamente a la GS, las mutaciones en R. phaseoli que causen un incremento en la sensibilidad a este compuesto, pueden estar ocasionadas por la pérdida o disminución en la actividad de alguna o ambas glutamino sintetasas. Este compuesto fue el utilizado para la

selección de las mutantes en la síntesis de glutamina.

Para poder determinar la concentración adecuada de MS para la selección de las mutantes, se determinó la sensibilidad de la cepa silvestre a este compuesto. La cepa CFN42 crece en medio mínimo sólido en presencia de 50 μ M de MS de igual manera que en MM en ausencia del inhibidor. Sin embargo, al incrementar la concentración a 250 μ M, se aprecia una considerable disminución en el crecimiento. Por tal motivo, se utilizaron cajas de MM con 25 y 50 μ M del inhibidor para la selección de las cepas sensibles a MS.

Para la obtención de las cepas anteriores, se eligió como agente mutagénico al transposón Tn $\bar{5}$; éste elemento confiere resistencia al antibiótico Kanamicina y no tiene sitios de reconocimiento para varias enzimas de restricción, por lo tanto, se hace más simple la clonación de las mutaciones, lo cual es de suma utilidad para poder efectuar un estudio detallado de la región en la que el transposón fue integrado. Por otra parte, es fácil la identificación de las bacterias con Tn $\bar{5}$, ya que la inserción de éste elemento confiere a la bacteria receptora resistencia a Kanamicina. El Tn $\bar{5}$ fue transferido por conjugación a la cepa CE3 (derivada Str $^{-}$ r de la cepa silvestre), y las derivadas Kan $^{-}$ r fueron replicados a los medios selectivos. Alrededor del 0.1% de las colonias Kan $^{-}$ r obtenidas de la mutagenesis, resultaron sensibles a MS. Las mutantes estudiadas en éste trabajo fueron obtenidas de tres mutagenesis independientes.

En cuanto al fenotipo de sensibilidad a MS, se lograron determinar claramente dos grupos de mutantes: unas cepas en las que se reprime por completo el crecimiento con 25 μ M de MS y otras mutantes que crecen menos que la cepa silvestre tanto en 25 como en 50 μ M del inhibidor en medio sólido (Tabla 3).

Caracterización Genética de las Mutantes.

El transposón Tn $\bar{5}$ no tiene sitios de reconocimiento para la endonucleasa EcoR1, de esta forma, el número de fragmentos de restricción generados al digerir con esta enzima el DNA de las transconjugantes Kan $^{-}$ r que hibridicen contra Tn $\bar{5}$, indica el número de inserciones de éste elemento en el genoma de las mutantes. Se purificó DNA total de las cepas CFN42 y MS-s y fue digerido con EcoR1, los fragmentos de restricción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa, transferidos a membranas de nitrocelulosa e hibridizados contra Tn $\bar{5}$ marcado con 32 P. Como puede observarse en la Figura 5, sólo un fragmento EcoR1 de cada una de las cepas hibridiza contra el detector radiactivo; estos resultados sugieren que únicamente fue insertado un transposón en cada una de las mutantes

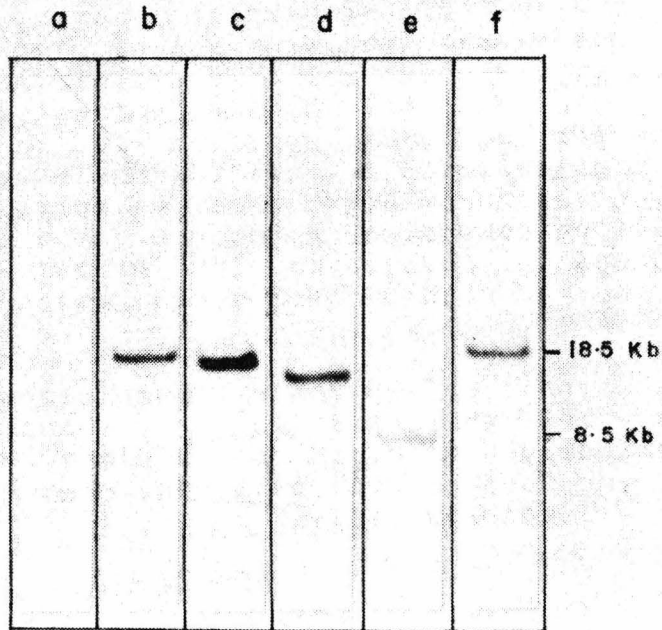


Figura 5 Hibridización del DNA de las Cepas CFN42 y Sensibles a MS vs ^{32}P pBR 322::Tn5. El DNA fue digerido con EcoRI e hibridizado vs ^{32}P pBR322::Tn5. (a), CFN42. (b), EM107. (c), EM203, (d), EM 306. (e), EM204. (f), EM205. Los fragmentos de restricción que hibridizaron vs Tn5 son de aproximadamente 18.0, 17.5 14.5, 8.5 y 18.5Kpb respectivamente.

sensibles a MS.

El plásmido pJB3 tiene la capacidad de movilizar marcadores cromosomales a alta frecuencia, por lo tanto, fue empleado para transferir la resistencia a Kanamicina, conferida por la inserción del transposón en el genoma de las mutantes, a la cepa CE3 (derivada Rif-r, Cam-r de la CFN42). Estos experimentos fueron llevados a cabo con el fin de analizar si el fenotipo MS-s se encuentra ligado a la resistencia al antibiótico. El plásmido pJB3 fue transferido por conjugación a las cepas mutantes, posteriormente fueron utilizadas como donadoras en cruces en las que se seleccionó la transferencia del transposón a la cepa CE3. Las transconjugantes Kan-r aparecieron a una frecuencia de 10^{-6} por receptora.

La sensibilidad a MS de las transconjugantes anteriores fue determinada. El total de las colonias analizadas resultaron sensibles a Metionina Sulfoximina, lo cual indica que el fenotipo esta ocasionado por la inserción del transposón en el genoma de las mutantes.

Actividad de las Glutamino Sintetasas de las Mutantes MS-s.

El fenotipo MS-s, puede estar ocasionado por la pérdida o disminución de la actividad de una o ambas GS, por una mayor entrada del inhibidor a las células, o por alguna alteración en la degradación de éste compuesto, que podría ser el resultado de tener afectada la actividad de aminoácido oxidasa, cistationasa o transaminasa de glutamina, ya que en otros organismos el MS puede ser degradado por estas enzimas. La actividad de las GS de las mutantes fue determinada en extractos crudos y en células totales permeabilizadas. La GSI se puede distinguir de la GSII debido a su diferencia en estabilidad a 50°C así como por su distinta sedimentación en gradientes de sacarosa (Darrow 1980). Con respecto a la actividad de las GS, se obtuvieron tres tipos de mutantes:

El primer tipo de mutantes lo constituyen las cepas EM107 y EM204. La cepa EM107 tiene niveles comparables de actividad de la GSI y de la GSII a los de la cepa silvestre, tanto en extractos crudos como en células totales permeabilizadas (Tabla 3). Asimismo, los perfiles de actividad de ambas cepas en gradientes de sacarosa son muy similares (Fig. 6A y 6C). Asimismo, en todos los experimentos llevados a cabo con extractos crudos o células totales permeabilizadas de la cepa EM204, no se aprecia diferencia en cuanto a las actividades de las dos GS, con las encontradas para la CFN42 (Tabla 3). En los gradientes de sacarosa corridos con los extractos de esta cepa, aunque no se lograron separar claramente los dos picos,

TABLA III. SENSIBILIDAD A METIONINA SULFOXIMINA Y ACTIVIDAD DE GSI Y GSII

C E P A	C R E C I M I E N T O			ACTIVIDAD DE TRANSFERASA	
	MM	MM+MS 25uM	MM+MS 50uM	GSI	GSII
CFN42	+	+	+	1.40	6.30
EM107	+	-	-	1.60	6.05
EM203	+	-	-	1.10	ND*
EM306	+	-	-	1.30	ND*
EM204	+	+/-	+/-	1.25	5.60
EM205	+	+/-	+/-	0.60	0.30

Las actividades de las Glutamino Sintetasas fueron determinadas por el método de transferasa (Bender et al 1977).

* No Detectado.

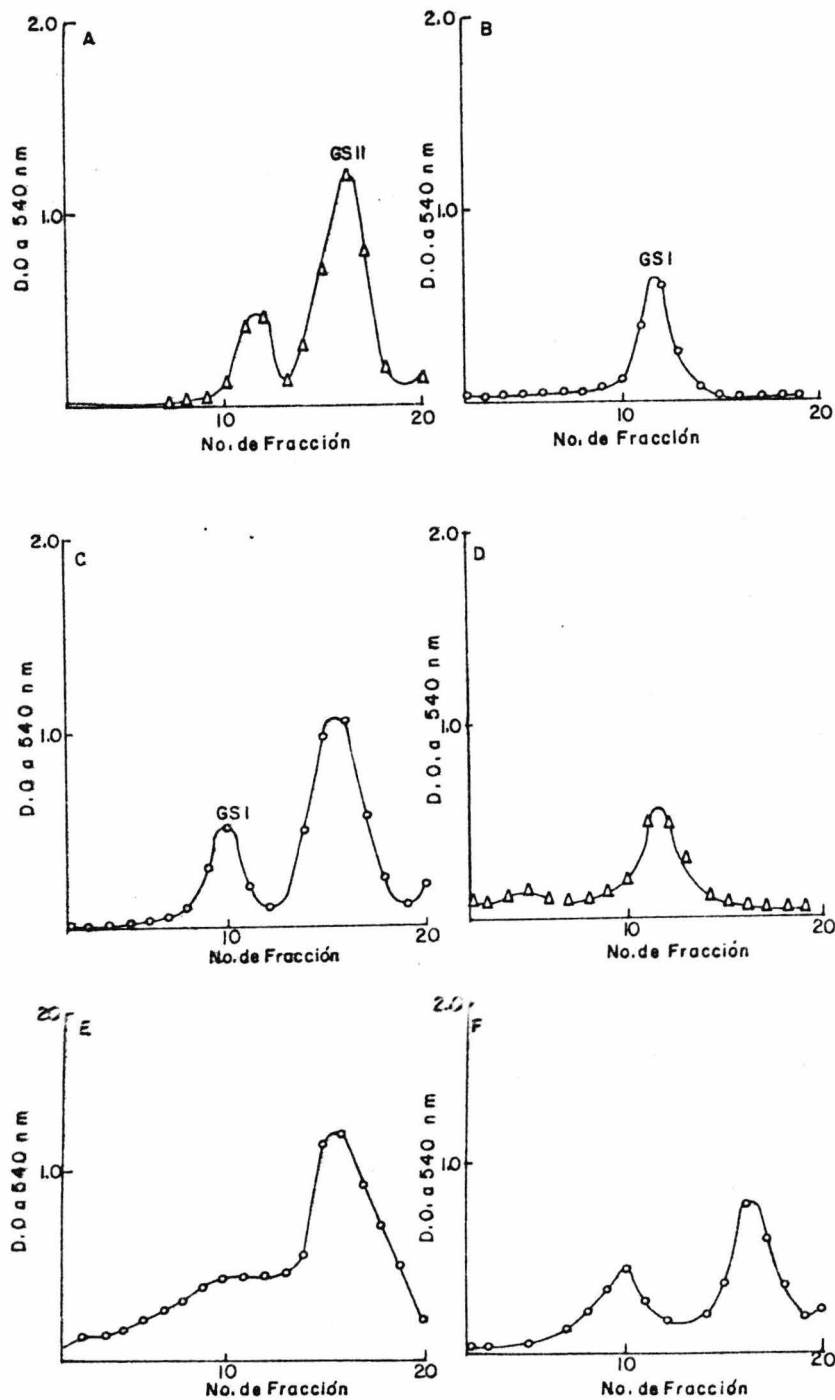


Figura 6 Sedimentación de las Glutamino Sintetasas en Gradientes de Sacarosa de las Cepas Sensibles a MS y de la Cepa CFN42. Las muestras fueron tomadas de un cultivo en MM glutámico a las 12h y sometidas a centrifugación en gradientes continuos de sacarosa (A) CFN42, (B) EM203, (C) EM107, (D) EM306, (E) EM204, (F) EM205.

se detecta actividad en las fracciones donde migran las GS (Fig. 6E).

En el segundo grupo de mutantes se encuentran las cepas EM203 y EM306. Estas cepas tienen actividad de GSI muy similar a la cepa silvestre. Sin embargo, en ninguna de las condiciones estudiadas se logró detectar actividad de la GSII (Tabla 3). En los gradientes con extractos de las mutantes anteriores, solamente se puede distinguir el pico de actividad correspondiente a la GSI, el cual es comparable al pico que presenta la cepa silvestre (Fig. 6B y 6D).

En el tercer grupo de mutantes esta la EM205. En todos los ensayos para determinar las actividades de las GS de esta cepa, se observa que a diferencia de la CFN42, no logra inducir la actividad de la GSII, y la actividad de la GSI se mantiene invariablemente por debajo de los valores obtenidos para esta misma enzima en la cepa silvestre (Tabla 3 y Fig. 7B). En los gradientes de sacarosa utilizados para la separación de las GS de esta mutante, se detecta la presencia de ambas enzimas, pero los picos de actividad son más pequeños que los obtenidos con los extractos de la CFN42 (Fig. 6F). Como se pudo determinar por el análisis genético de las mutantes, el fenotipo está causado por la inserción del transposón. Por lo tanto, una sola mutación es responsable de reprimir la inducción de ambas GS. Como se muestra en la Figura 7A, la cepa EM205 tiene una pendiente de crecimiento menor que la cepa silvestre en medio mínimo con glutámico como fuente nitrogenada y su crecimiento no es estimulado por glutamina.

Propiedades Simbióticas de las Mutantes MS-s.

Las cepas obtenidas de la mutagénesis con Ta5 se emplearon para inocular las raíces de plantas de frijol para determinar su capacidad para nodular y fijar nitrógeno. A los tres días de haber germinado, las plantas fueron inoculadas con las cepas MS-s. A los 12, 18 y 21 días después de la infección, las raíces de las plantas fueron cortadas para determinar de las actividades de la nitrogenasa.

Las cepas EM 107, EM203 y EM306 tienen niveles de actividad de la nitrogenasa muy similares a los encontrados para la cepa CFN42, tanto a los 12 como a los 18 y 21 días después de la infección (Tabla 4). Asimismo, en estas cepas no se aprecia ninguna diferencia en la nodulación en relación con la cepa silvestre.

Cuando se infectan plantas de frijol con la cepa EM204, se producen nódulos muy similares en la forma y el tamaño a los inducidos por la CFN42, estos nódulos son de color rosa

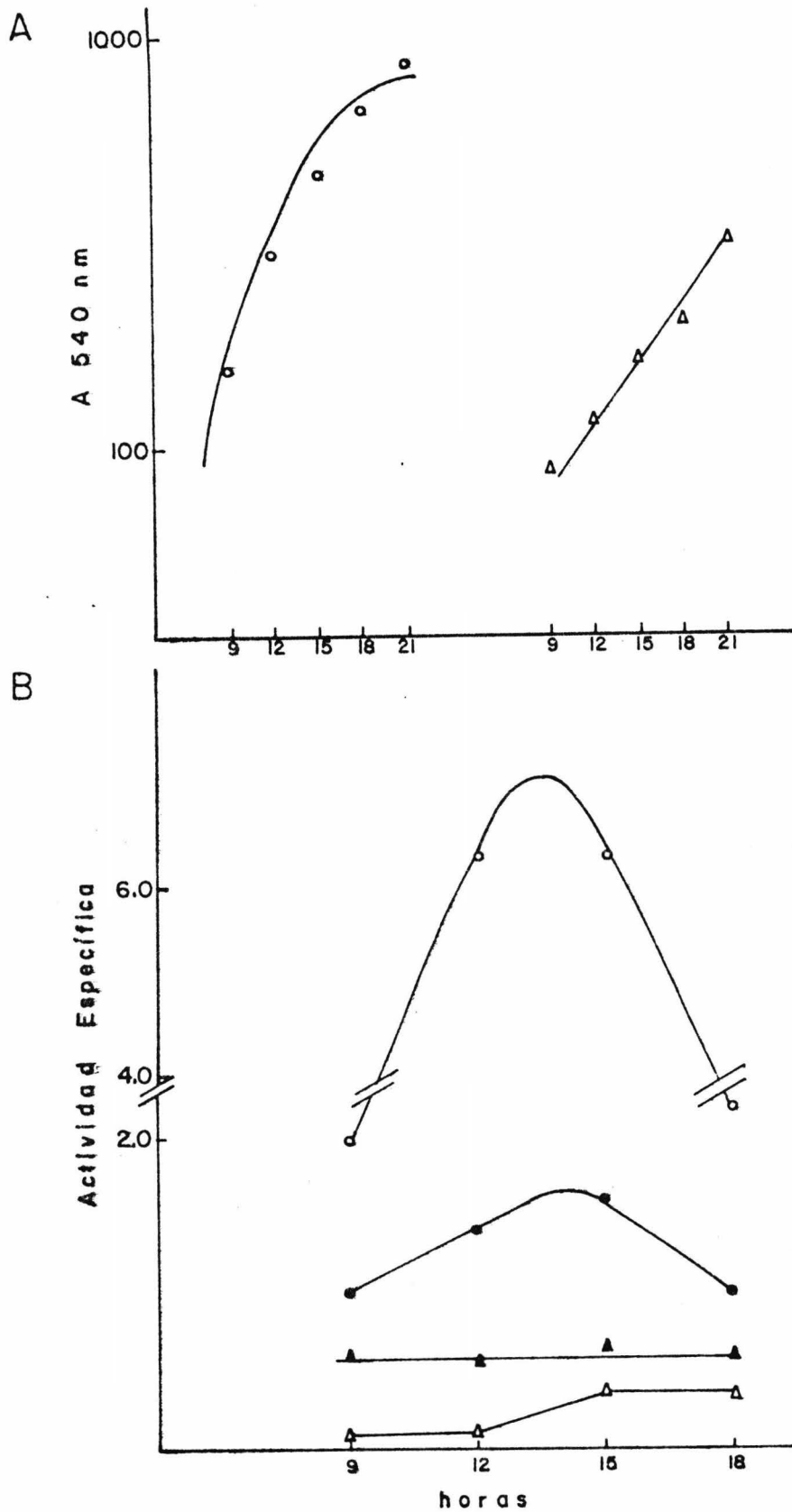


Figura 7 Curva de Crecimiento y Actividad de GSI y GSII de las Cepas CFN42 y EM205. A Curva de crecimiento en MM glutámico, (○) CFN42 (▲) EM205. B Actividad de GSI y GSII en células permeabilizadas, (●) CFN42 GSI, (○) CFN42 GSII, (▲) EM205 GSI, (△) EM205 GSII.

TABLA IV. PROPIEDADES SIMBIOTICAS DE LAS CEPAS MS^S

CEPA	ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA			NODULACION
	12 Días	18 Días	21 Días	
CFN42	+++	+++	+++	+++
EM107	+++	+++	+++	+++
EM203	+++	+++	+++	+++
EM306	+++	+++	+++	+++
EM204	-	5-20% ^o	5-20% ^o	+++
EM205	-	-	-5%*	+/-

La actividad de la nitrogenasa fue determinada midiendo la reducción de acetileno por cromatografía de gases.

* Sólo detectado en algunos experimentos.
^o Porcentage de la actividad de la CFN42

pálido y al determinarles la actividad de la nitrogenasa, se observa que sólo son capaces de reducir el nitrógeno molecular los nódulos de 18 y 21 días. La actividad de la nitrogenasa de esta cepa es en todos los casos menor al 20% de lo encontrado para la CFN42 (Tabla 4).

Los nódulos formados en los raíces de frijol infectadas con la cepa EM205, son mas pequeños que los desarrollados por la infección con la CFN42, asimismo, los nódulos son de color blanco, lo cual es un indicio de deficiencia en la fijación de nitrógeno. Las raíces de los plantas infectados con esta cepa fueron cortadas a los 12, 18 y 21 días después de la infección para determinar la actividad de la nitrogenasa. En los primeros dos casos, no fue posible la detección de reducción de acetileno, pero en algunos experimentos con los nódulos de las raíces cortadas a los 21 días de infección, fue posible detectar una actividad muy reducida (Tabla 4).

Localización Física del Transposón.

Las bacterias del género *Rhizobium* contienen plásmidos de alto peso molecular que fluctúan entre 100 y 300 Megadaltons (Nuti *et al* 1977, Cosse *et al* 1979). Generalmente los genes involucrados en el proceso de la nodulación, así como los genes requeridos para la actividad de la nitrogenasa, se encuentran en uno sólo de estos megaplásmidos. A este plásmido se le ha denominado plásmido Simbiótico (Sim), puesto que contiene información necesaria para la nodulación y la fijación de nitrógeno (Nuti *et al* 1979). La cepa silvestre de *R. phaseoli* CFN42 tiene seis megaplásmidos (denominados p42a a p42f de acuerdo a su orden ascendente en peso molecular). El plásmido p42d ha sido identificado como el plásmido Sim, puesto que las cepas curadas de éste elemento pierden su capacidad para nodular (Palacios *et al* 1983, Leemans *et al* 1984). Asimismo, éste plásmido contiene tres copias idénticas del gene *nifH* (Quinto *et al* 1982), también se ha observado que al introducir el p42d a una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* se logra que este organismo nodule a *Phaseolus vulgaris* (Leemans y Megias comunicación personal).

Con el fin de identificar el elemento genético en el cual el transposón fue insertado, los plásmidos de los mutantes fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, transferidos a membranas de nitrocelulosa e hibridizados contra el plásmido pBR322::Tn5, previamente marcado con 32P. Como se muestra en la Figura 8, todos los cepas MS-s obtenidas de los cuatro aislamientos independientes, conservaron el mismo patrón de migración electroforética de sus plásmidos que el de la cepa original. El transposón se integró en el cromosoma en todas las cepas analizadas, a excepción de la cepa EM204 en la que el Tn5 se insertó en un plásmido de peso

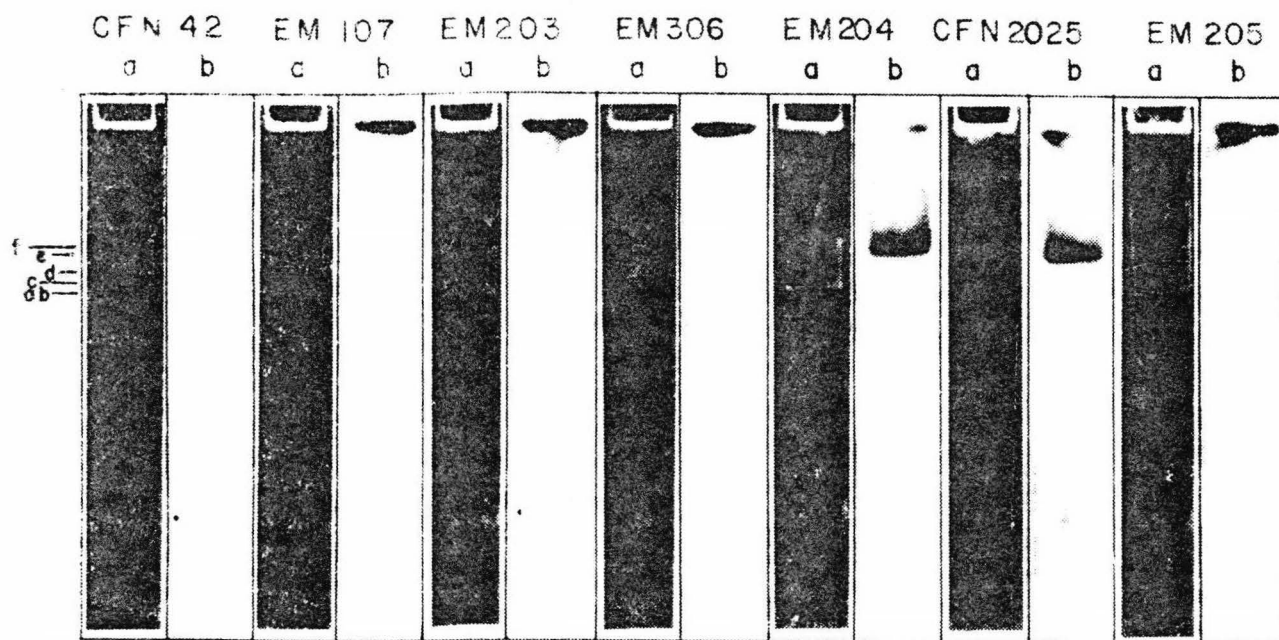


Figura 3. Patrón Electroforético de los Plásmidos de las Mutantes Sensibles a MS y de la Cepa CFN42 e hibridización vs ^{32}P pBR322::Tn5. La inserción del transposón en los diferentes elementos genéticos de las Cepas Sensibles a MS fue determinado mediante la hibridización de Tn5 vs el patrón electroforético de los plásmidos. (a) patrón de los plásmidos después de teñir el DNA con bromuro de etidio (b) Hibridización vs ^{32}P pBR322::Tn5 del patrón de los plásmidos transferidos a membranas de nitrocelulosa.

molecular muy semejante al plásmido Sim (Fig. 8). Como esta cepa tiene disminuida la actividad de la nitrogenasa, originalmente se pensó que el transposón se había insertado en el plásmido Sim, posiblemente en un gene regulador de la expresión de los genes nif, pero posteriormente se obtuvo la cepa CFN2025 (derivada de la EM204 curada del plásmido Sim). Los plásmidos de esta mutante fueron separados e hibridizados vs 32P pBR322::Tn₅. Como se muestra en la figura 8, esta cepa perdió el plásmido Sim, sin embargo, el Tn₅ sigue hibridizando con un plásmido, el cual resulta ser el p42e.

Análisis del RNA mensajero para la Nitrogenasa de las Cepas MS-s.

En R. meliloti las moléculas del RNA mensajero para la nitrogenasa son sintetizadas solamente cuando éste organismo se encuentra como bacteroide, dentro de los nódulos de las plantas (Sundaresan et al 1983).

Con el fin de determinar la expresión de los genes nifH de aquellas cepas sensibles a MS que presentan menor actividad de la nitrogenasa, se purificó RNA total de las diferentes cepas a partir de un cultivo líquido en la fase estacionaria de crecimiento. El RNA fue dividido en dos alícuotas, una fue tratada con 10ug/ml de RNAasa y la otra se congeló hasta su utilización. Ambas muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por filtración y se hibridizaron vs un fragmento que contiene gran parte de la secuencia interna del gene nifH de Rhizobium phaseoli (Quinto et al en prensa). Los resultados se muestran en la Figura 9. Sorprendentemente, existe transcripción del gene nifH en vida libre, al menos en la fase estacionaria de crecimiento, tanto en la cepa silvestre, como en todas las mutantes MS-s (Fig. 9). Este experimento fue diseñado para detectar RNA en vida libre puesto que la cepa EM205 no produce nódulos de tamaño adecuado para su manipulación.

Análisis de la Organización Genómica de la Clona pSM204 en Varias Cepas Nativas de R. Phaseoli.

El concepto de que un sólo plásmido contiene toda la información para la nodulación y la fijación de nitrógeno, tal vez no se extienda a todas las especies de Rhizobium. Gloria Soberon (1983) ha encontrado que la pérdida de la capacidad para nodular frijol de varias cepas de R. phaseoli, no se puede correlacionar en todos los casos con la pérdida de un plásmido. Como se mencionó previamente, el plásmido p42d de

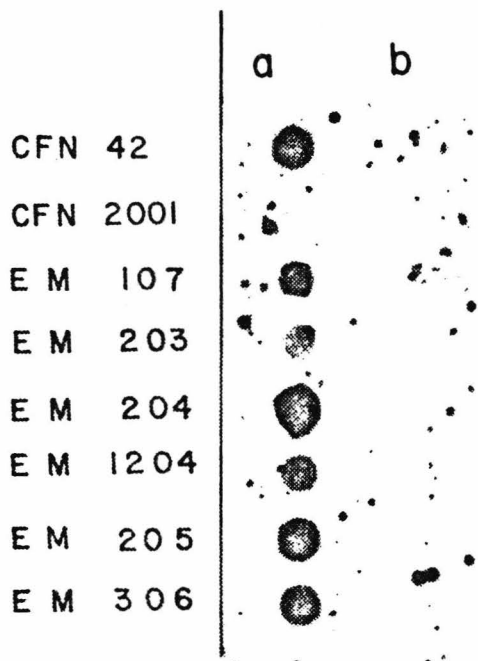


Figura 9 Hibridización vs ^{32}P nifH del RNA de las Cepas MS^S, CFN2001, y CFN42. El RNA fue purificado como se describe en la metodología, transferido a membranas de nitrocelulosa e hibridizado vs el fragmento interno B del gene nifH de la Cepa CFN42. (Quinto et al en prensa) (a) Muestra sin incubar con RNAasa. (b) muestra incubada 15min a 37°C con 10µg/ml de RNAasa.

la cepa CFN42 ha sido identificado como el plásmido Sim, sin embargo, la curación del p42c o una mutación en el plásmido p42e, como el caso de la cepa EM204, tienen como consecuencia una sustancial disminución en la actividad de la nitrogenasa. Estos resultados sugieren que la información para una nodulación óptima, así como para la fijación de nitrógeno en la cepa CFN42, está distribuida en más de un replicón.

Si la mutación que origina la disminución en la actividad de la nitrogenasa en la cepa EM204 se encuentra en un gene cuyo producto es indispensable para la simbiosis, entonces este gene deberá de encontrarse presente en todas las cepas que nodulen frijol. Por otra parte, es de interés determinar si éste gene es plasmidiano en otras cepas, ya que los genes involucrados en la simbiosis normalmente se localizan en plásmidos. Para contestar estas preguntas, se clonó el fragmento de restricción EcoRI de 8.5Kpb que contiene al Tn5 de la cepa EM204 resultando el plásmido pSM204. Este plásmido fue utilizado como detector de hibridización en experimentos en los que los megaplosmidos de una serie de cepas de R. phaseoli de distintos orígenes, fueron separados por electroforesis y transferidos a membranas de nitrocelulosa (Fig. 10a). Como se muestra en la Figura 10b, en la mayoría de las cepas estudiadas la hibridización ocurre invariablemente en alguno de los plasmidos indigenos, a excepción de la CFN88, sin embargo, en esta cepa si existe una secuencia con cierta homología con pSM7, la cual se aprecia en experimentos del tipo Southern (S. Moreno no publicado). La cepa CFN88 fue aislada en el mismo campo de cultivo que la CFN42 y, al igual que esta cepa, nodulo y fija nitrógeno en P. vulgaris.

Mutagenesis con Tn7 de la Cepa EM306.

En las enterobacterias, el gene estructural para la GS se encuentra formando parte de un operón junto con los genes reguladores glnL y glnG. Este operón es transcrito principalmente a partir de uno de los promotores que se encuentra en la region 5' del gene glnA (Rocha et al, en prensa). En la introducción se mencionó que mutaciones en glnG, así como las mutaciones polares en glnA de K. pneumoniae, causan la perdida de la actividad de la nitrogenasa. Con el objeto de estudiar en R. phaseoli la región cromosomal análogo a lo anterior, se intentaron obtener mutaciones polares en el gene que codifica a GSI. Una manera de seleccionar los mutantes anteriores, sería por medio de la inserción de un transposón en el gene para GSI de la cepa EM306. Puesto que esta cepa no tiene actividad de GSII, las mutantes se seleccionarían como auxotrofas de glutamina. El experimento anterior se llevo a cabo en tres ocasiones, utilizando al transposon TnZ como agente mutagénico. Las

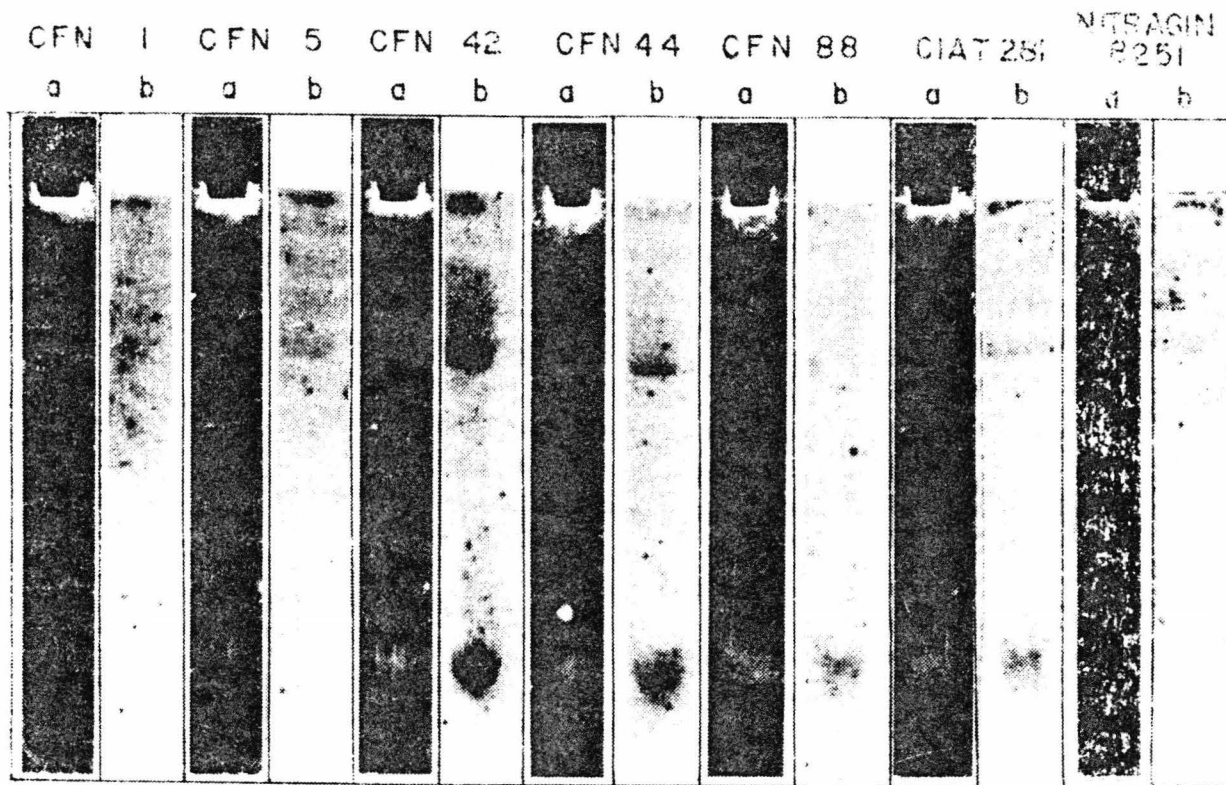


Figura 10 Hibridización vs ^{32}P pSM204 del Patrón de Plásmidos de Varias Cepas de Rhizobium phaseoli de Distintos Orígenes. Los plásmidos de varias Cepas de Rhizobium phaseoli fueron separados por electroforesis (a) e hibridizados vs ^{32}P pSM204

células de la cruz fueron plateadas sobre medio selectivo, las transconjugantes Sp^{-r} aparecieron a una frecuencia de 10⁻⁴ por receptora y en aproximadamente 10 000 colonias Sp^{-r} analizadas, no se encontró ningún auxótrofo de glutamina. La frecuencia de aparición de auxótrofos con este método fue de menos del 0.1%, diez veces menor que lo obtenido con Tn5, lo cual sugiere que el transposon TnZ tiene sitios de alta afinidad de inserción en el genoma de E. phaseoli.

Análisis de las Reiteraciones del Gene nifH en las Mutantes MS-s.

La cepa CFN42 tiene tres copias del gene nifH en el plasmido Sim (Quinto et al 1982). Estos genes han sido clonados y su secuencia determinada. Sorprendentemente, no fue encontrada ninguna diferencia en la secuencia de las tres copias (Quinto et al en prensa). Debido a que las cepas EM204 y EM205 tienen disminuida la capacidad para fijar nitrógeno, se decidió observar si el patrón de las reiteraciones del gene nifH en estas cepas permaneció sin alteración. Como se muestra en la Figura 11, los fragmentos de restricción EcoR1 que contienen a este gene se mantuvieron sin cambio en todas las cepas MS-s.

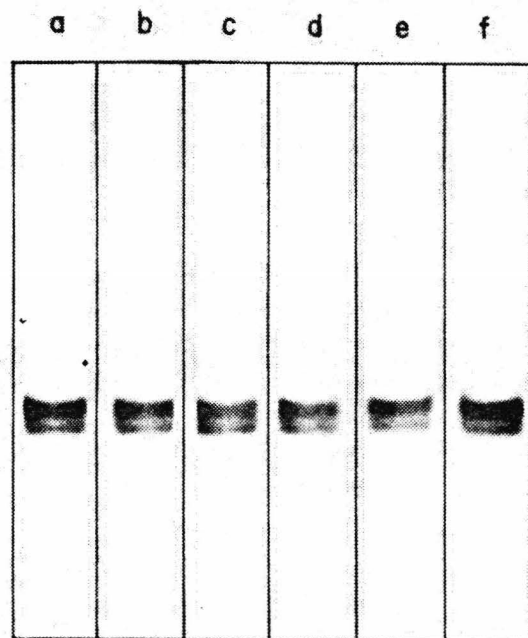


Figura 11 Hibridización del DNA de las Cepas CFN42 y Sensibles a MS vs ^{32}P pCQ 152. El DNA fue digerido con EcoRI e hibridizado vs ^{32}P pCQ152 (a) CFN42, (b) EM107, (c) EM203, (d) EM306, (e) EM204, (f) EM205.

DISCUSION

En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización de una serie de mutantes de R. phaseoli sensibles al inhibidor específico de la actividad de la GS L-Metionina D-L-Sulfoximina. Las mutaciones en estas cepas fueron originadas por la inserción del transposón Tn5 en el genoma de una derivada Str^r de la cepa silvestre CFN42. Las mutantes anteriores fueron aisladas para analizar si la asimilación de amonio y la fijación de nitrógeno en este organismo están controladas por un mecanismo regulatorio común.

De los tres experimentos independientes para la selección de las mutantes, se obtuvieron cuatro grupos de cepas de acuerdo a su fenotipo. Como se puede apreciar en el experimento en el que los fragmentos de restricción de las mutantes se hibridizaron contra Tn5 (Fig. 5), sólo aparece una banda de hibridización, lo cual sugiere que hubo una sola inserción de este elemento en cada una de las mutantes. Por otra parte, la transferencia de la resistencia a Kanamicina de las mutantes MS-s a la CE2, está ligada con la sensibilidad a MS, lo cual indica que la inserción del transposón es la causa del fenotipo.

En ninguno de los experimentos para determinar las actividades de GS en las cepas EM203 y EM306, tanto en extractos crudos como en células totales permeabilizadas, se detectó actividad de la GSII. Los perfiles de actividad de GS de estas cepas en gradientes de sacarosa, son idénticos a los encontrados para la cepa silvestre en las fracciones correspondientes a la migración de la GS I, pero en las fracciones donde normalmente migra la GSII, no se aprecia ninguna actividad por arriba del nivel basal. Recientemente, en el laboratorio del Dr. Jaime Mora, A. Bravo ha determinado las actividades enzimáticas de las GS de la cepa EM203, tanto por el método de transferasa como por el de sintetasa; al igual que lo reportado en este trabajo, no se ha detectado actividad de transferasa de la GSII, pero al efectuar las determinaciones enzimáticas por el método de sintetasa, sí se encuentra actividad de la GSII. Hasta el momento no ha sido posible establecer con certeza las bases de este comportamiento, sin embargo, el fenotipo de estas mutantes sugiere que las inserciones pueden encontrarse en un gene cuyo producto se requiere para reprimir a una proteína modificadora de la GSII, que normalmente funciona para la represión de la

actividad de esta enzima en ciertas condiciones fisiológicas. La interpretación anterior esta basada principalmente en dos resultados; por un lado, la actividad de sintetasa de la GSII de la EM203 es más sensible a la temperatura que la de la enzima de la cepa silvestre, y por otra parte, al mezclar extractos de ambas cepas, disminuye la actividad de la GSII de la silvestre (A. Bravo y J. Mora, comunicación personal). El fenotipo de estas mutantes sugiere que las mutaciones se localizan en un gene que regula la actividad de la GSII, pero no es requerido para la actividad de la GSI ni para la expresión de los genes que participan en la fijación de nitrógeno. Los transposones en estas mutantes se encuentran separados por 0.6Kpb (S. Moreno comunicación personal).

Al igual que las cepas EM203 y EM306, las mutaciones que sólo afectan la actividad de la GSII de Rhizobium Sp no alteran la fijación de nitrógeno (Ludwig 1980).

La cepa EM205, tiene niveles reducidos de actividad de las dos GS, los nódulos formados al infectar las raíces de frijol con esta cepa son muy pequeños, de color blanco y con actividad de nitrogenasa apenas detectable a los 21 días después de la infección. Los nódulos formados en las raíces de alfalfa infectadas con las cepas de R. meliloti auxotrofos de glutamina (Kondorosi et al 1977), así como con la mutante en el gene análogo a nifA (Zimmerman et al 1983), son muy semejantes en cuanto a número, color y tamaño, a los formados con la EM205.

Estos resultados indican que en la cepa EM205, el transposón se encuentra insertado en un gene cuyo producto es indispensable para el desarrollo normal de la simbiosis, así como para la regulación de la asimilación de amonio. Como se mencionó en la introducción, los resultados obtenidos por Ludwig (1980) y por Kondorosi (1977), sugieren que en Rhizobium, la regulación de la asimilación de amonio y de la fijación de nitrógeno podrían estar relacionadas pero, a diferencia de este trabajo, estos autores no pudieron demostrar el número de mutaciones que causaron su fenotipo.

En este mismo laboratorio, G. Espin aisló una mutante con fenotipo similar a la EM205. Esta cepa, al igual que las mutantes reportadas en este trabajo, fue aislada como sensible a MS y la mutación fue originada por la inserción de Tn5 en el genoma de la cepa CE3. El fragmento EcoRI que lleva la resistencia a Kanamicina conferida por el Tn5 fue clonado y utilizado para recuperar de un banco de genes de R. phaseoli en el fago λ 1059 la secuencia silvestre. Del experimento anterior resultó el plásmido pSM7 el cual es un derivado de pBR327 que lleva clonado un fragmento EcoRI de 13 Kpb. Al hibridizar este plásmido contra una digestión de DNA total de la cepa silvestre con EcoRI, se observa el fragmento correspondiente a 13Kpb, el cual desaparece cuando se

hibridiza este plásmido vs DNA de la GE2 o de la EM205, y en lugar de este fragmento, se observa una banda de 18.5 Kpb (Fig. 11C), que es la misma que aparece al hibridizar contra Tn5 (Fig. 11A). Estos resultados indican que ambas mutaciones mapean en un mismo fragmento EcoRI, pero dado el tamaño de este fragmento, no se puede concluir que las inserciones en ambas cepas se encuentren en un mismo gene. Para determinar la proximidad de las inserciones, se repitió el experimento pero ahora se digirió DNA de ambas cepas con BamHI. El Tn5 tiene un sólo sitio de reconocimiento para esta enzima en la region central de su secuencia, por lo tanto, al digerir DNA total con esta enzima e hibridizarlo contra Tn5, deben de observarse dos bandas. Los fragmentos de restricción generados por la digestión con BamHI del DNA de las cepas EM205 y GE2 fueron hibridizados vs 32P pBR322::Tn5. Como se observa en la Figura 11B, la suma de los pesos moleculares de las dos bandas que aparecen en cada cepa son iguales, lo cual indica que las inserciones del Tn5 en ambas cepas se encuentran en un mismo fragmento BamHI, asimismo, se puede concluir que los sitios de inserción de este elemento estan separados por 0.2 o por 1.2Kpb.

Por otra parte, el patrón de plásmidos de la cepa silvestre fue hibridizado vs pSM7, y puede apreciarse que dicho plásmido tiene homología con los plásmidos p42a y p42d. La secuencia homóloga en el plásmido p42a no es indispensable para la simbiosis, puesto que las cepas curadas de este plásmido nodulan y fijan nitrógeno igual que la cepa silvestre (Leemans *et al* 1984). El papel de la secuencia homóloga a pSM7 en el plásmido Sim, no ha sido aclarado; para estudiar esta región, es necesaria la construcción de un banco de genes del plásmido Sim de la cepa silvestre. Este banco se hibridizaría vs pSM7 y las clonas positivas se recuperarían para mutagenizarlas y reintroducirlas a la cepa silvestre para determinar su función. La secuencia del pSM7 que hibridiza con el plásmido p42d, podría ser la correspondiente al gene mutado, pero debido al gran tamaño del detector, es posible que no sea esta la secuencia responsable de la hibridización. Este banco sería también de gran utilidad para poder determinar si en el plásmido Sim existe algún gene con homología a *nifA* de *K. pneumoniae*.

Como se mencionó en la introducción, las mutaciones en los genes *glnG* y *glnF* de *K. pneumoniae* alteran tanto la asimilación de amonio como la fijación de nitrógeno. Las mutantes GE2 y EM205 tienen un fenotipo similar a las mutantes Ntr de *K. pneumoniae*, por lo tanto, el Tn5 podría encontrarse en un gene análogo a los genes *gln* de este organismo. El plásmido pMM12 lleva la región *glnG* y *glnI* de *K. pneumoniae* (Espín *et al* 1982), y fue utilizado como detector de hibridización contra DNA total de la cepa CFN42. En estos experimentos se detectan dos fragmentos EcoRI, pero ninguno coincide con el fragmento EcoRI de 13Kbp mutado en las cepas

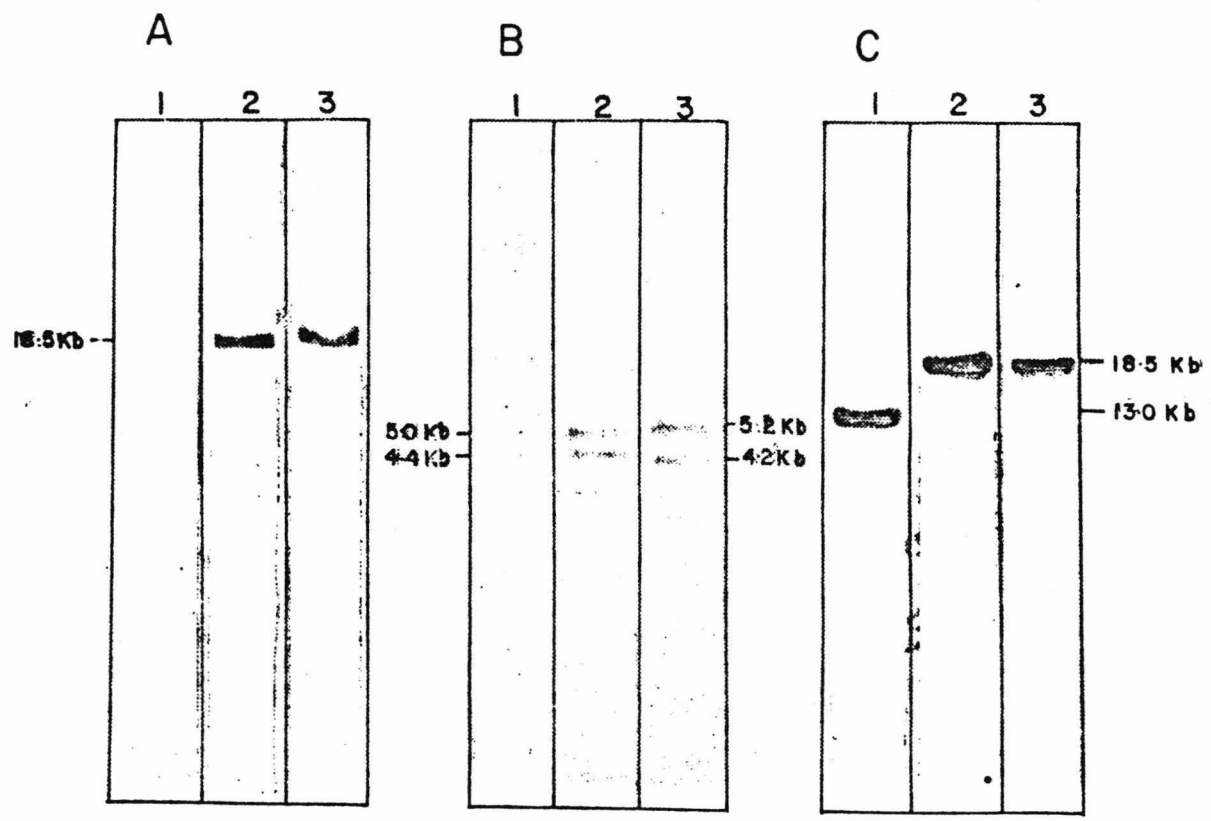


Figura 12 Hibridización de DNA Total de las Cepas CFN42 EM205 y GE2 vs ^{32}P pBR322::Tn5 y vs ^{32}P pSM7. El DNA de las cepas CFN42, EM205 y GE2 fue purificado y digerido con EcoRI (A y C) o con BamHI (B). El DNA fue separado por electroforesis, transferido a membranas de nitrocelulosa e hibridizado vs ^{32}P pBR322::Tn5 (A y B) o vs ^{32}P pSM7 (C).

con menor actividad de las GS y de la nitrogenasa, por lo tanto, la mutación de las cepas EM205 y GE2 no está en un gene homólogo a glnG de K. pneumoniae. Para determinar si las mutaciones en las cepas EM205 y GE2 están en un gene con homología a glnF, se clonó la mutación de E. coli MX848 (glnF::Tn5) (Osorio et al 1984) con EcoRI para utilizar el gene glnF como detector de hibridización en experimentos como el anterior. El plásmido obtenido contiene un inserto de 20Kpb que resulta demasiado grande para la obtención de resultados claros, por lo tanto, es necesaria la subclonación de este plásmido para tratar de determinar si existe homología con el genoma de R. phaseoli.

La cepa EM204 no tiene ninguna alteración en la síntesis de glutamina, pero tiene reducida sustancialmente la capacidad para fijar nitrógeno. En esta cepa la inserción del transposón mapea en el plásmido p42e, un megaplasmiido diferente al simbiótico. Asimismo, en la cepa CFN42 el plásmido p42c se encuentra involucrado en la simbiosis, puesto que cepas curadas de este plásmido nodulan y fijan menos que la cepa silvestre (J. Leemans no publicado). Por tal motivo, se puede concluir que en la cepa CFN42 de R. phaseoli, los genes involucrados en las funciones simbióticas se encuentran cuando menos en cuatro elementos genéticos diferentes. Por el momento la naturaleza de esta mutante no es clara, fue aislada como sensible a MS pero no tiene alteradas las GS y sin embargo, si fue afectado su fenotipo simbiótico. Esta mutante puede estar en un gene cuyo producto no este directamente relacionado con los genes nif, pero que ejerzo un efecto pleiotrópico sobre estos genes. En el laboratorio ha sido aislada otra mutante, la GE40, que tiene fenotipo similar y tambien mapea en el plásmido p42e.

Como se mencionó en los resultados, el fragmento EcoRI que contiene al transposón en la cepa EM204 fue clonado y utilizado como detector de hibridización, con el fin de analizar si esta secuencia se encuentra en plásmidos o en el cromosoma en otras cepas nativas de R. phaseoli. Los resultados obtenidos indican que en todas las cepas estudiadas existe una secuencia homóloga a pSM204, y que este gene se encuentra principalmente en plásmidos.

La mutante EM107 no tiene alterada la síntesis de glutamina ni la capacidad para fijar nitrógeno. Por la forma de selección empleada, se esperaba encontrar mutantes de este tipo, ya que la sensibilidad a MS puede estar ocasionada por otros factores distintos a la disminución de la actividad de GS; por ejemplo: menor capacidad de degradación de MS, así como por un transporte más eficiente de este compuesto.

Los experimentos llevados a cabo con el fin de seleccionar auxótrofos de glutamina a partir de la cepa FM306, no dieron los resultados esperados. El número reducido de

auxótrofos obtenidos por la mutagenesis con TnZ, sugiere que este elemento puede tener sitios de alta afinidad para su integración. Recientemente, en este mismo laboratorio, M. Flores encontró que las inserciones de TnZ en el plásmido p42d se obtienen invariabilmente en un mismo fragmento de restricción. Hasta el momento se desconoce si esta es la única secuencia de alta afinidad para TnZ en el genoma de la CFN42. Por otra parte, dado que la mutante EM203 tiene el mismo fenotipo que la EM306, y considerando que la EM203 tiene actividad de sintetasa, posiblemente no se encontraron los auxótrofos de glutamina porque la cepa que fue mutagenizada conserva aún la actividad de sintetasa de ambas GS.

Los resultados obtenidos del experimento de hibridización del RNA de las cepas CFN42, CFN2001 y MS-s contra 32P nifH, indican que este gene esta siendo transcrito en vida libre. Debido a que el experimento fue sólo cualitativo, no es posible determinar el grado de expresión de nifH. Sin embargo, se puede concluir que, al menos en vida libre, ninguna mutante perdió por completo la capacidad de transcribir dicho gene. Por otra parte, este experimento abre la posibilidad de poder seleccionar mutantes regulatorias de la expresión de los genes nif en placa. Para poder desarrollar lo anterior, es necesaria la construcción de fusiones del gene nifH con lacZ. Con las fusiones en la cepa silvestre, se podría mutagenizar y seleccionar las colonias que perdieran la actividad de β galactosidasa. En este momento, se tiene desarrollada en el laboratorio la metodología necesaria para su construcción.

El método de obtención de las mutantes permite la selección de cepas con alteraciones simbióticas, sin tener que seleccionarlas por el análisis del fenotipo en planta.

Con el fin de determinar de una manera directa si en R. phaseoli existen genes físicamente análogos a los genes gln de las enterobacterias, y si estos regulan de alguna manera la expresión de la nitrogenasa en este organismo, es necesario contar con los detectores adecuados para la identificación de las secuencias de interés por medio de experimentos de hibridización del tipo Southern. Por el momento existen en el laboratorio plásmidos que contienen a los genes glnL y GlnG tanto de E. coli como de K. pneumoniae, asimismo, se tiene ya clonada una inserción de Tn5 en el gene glnF de E. coli. En algunos experimentos previos, se han logrado detectar dos fragmentos de EcoRI del genoma de la CFN42 que hibridizan contra el plásmido pMM12, uno de estos fragmentos se encuentra en el plásmido Sim y el otro posiblemente sea cromosomal; estos resultados sugieren que en R. phaseoli pueden existir genes homólogos a glnG y a nifA, por lo tanto, se trataran de recuperar estas secuencias del banco de genes en λ 1059 para mutagenizarlas y reintroducirlas en la cepa silvestre con el objeto de analizar si estos genes participan en la regulación

de la asimilación y de la fijación de nitrógeno en E.
phaseoli.

- F. C. (1981a). Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* (London) 294: 776-778.
- Buchanan-Wollaston, V., Cannon, M. C., Beyon, J. L., Cannon, F. C. (1981b). Use of cloned *nif* (nitrogen fixation) DNA to investigate transcriptional regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* 184: 102-106.
- Buchanan-Wollaston, V., Cannon, F. (1984). Regulation of *nif* transcription in *Klebsiella pneumoniae*. En: *Advances of nitrogen fixation research*. Veeger, C., Newton, W. E. (eds.). The Hague, Nijhoff/Junk p 732.
- Casse, F., Bouchery, C., Julliot, J. S., Michel, M., Denarie, J. (1979). Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113: 229-242.
- Darrow, R. A., Knotts, R. R. (1977). Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 554-559.
- Darrow, R. A. (1980). Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. En: *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation*. Mora, J. and Palacios, R. (eds.) Academic Press New York. p 139-136.
- Dixon, R., Eady, R. R., Espin, G., Hill, S., Ioccarino, M., Kahn, D., Merrick, M. (1980). Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions. *Nature* (London) 286: 128-132.
- Dixon, R., Alvarez-Morales, A., Clements, J., Drummond, M., Merrick, M., Postgate, J. R. (1984). Transcriptional control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. En: *Advances in nitrogen fixation research*. Veeger, C., Newton, W. E. (eds.). The Hague Nijhoff/Junk Pudoc p: 635-642.
- Downie, J. A., Ma, Q. S., Knight, C. D., Hombrecher, G., Johnston, A. W. B. (1983). Cloning of the symbiotic region of *Rhizobium leguminosarum*: the nodulation genes are between the nitrogenase genes and a *nifA*-like gene. *EMBO J.* 2: 947-952.
- Drummond, M., Clements, J., Merrick, M., Dixon, R. (1983). Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* (London) 301: 302-307.
- Eady, R. R., Issack, R., Kennedy, C., Postgate, J. R., Ratcliffe, H. D. (1978). Nitrogenase synthesis in *K. pneumoniae*: Comparison of ammonium and oxygen regulation. *J. Gen. Microbiol.* 104: 277-285.

REFERENCIAS

- Ausubel, F. M., Cannon, F. C. (1981). Molecular genetic analysis of Klebsiella pneumoniae nitrogen-fixation (nif) genes. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 45: 487-499.
- Backman, K., Chen, Y. M., Magasanik, B. (1982). Physical and genetic characterization of the glnA-glnG region of the Escherichia coli chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3743-3747.
- Bender, R. A., Janssen, K. A., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Foory, F., Magasanik, B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 129: 1001-1009.
- Beringer, J. E., Brewin, N., Johnston, A. B. W., Schulman, H. M., Hopwood, D. A. (1979). The Rhizobium-legume symbiosis. Proc. R. Soc. Lond. B. 204: 219-233.
- Beynon, J., Cannon, M., Buchanan-Wollaston, A. V., Cannon, I. (1983). The nif promoters of Klebsiella pneumoniae have a characteristic primary structure. Cell 34: 665-675.
- Boyer, H. B., Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41: 459-472.
- Brewin, N. J., Beringer, J. E., Johnston, A. B. W. (1980). Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 120: 413-420.
- de Bruijn, F. J., Ausubel, F. M. (1981). The cloning and transposon Tn5 mutagenesis of the glnA region of Klebsiella pneumoniae: Identification of glnR, a gene involved in regulation of the nif and hut operons. Mol. Gen. Genet. 183: 289-297.
- de Bruijn, F. J., Ausubel, F. M. (1983). The cloning and characterization of the glnF (ntrA) gene of Klebsiella pneumoniae: Role of glnF (ntrA) in the regulation of nitrogen fixation (nif) and other nitrogen assimilation genes. Mol. Gen. Genet. 192: 342-353.
- Buchanan-Wollaston, V., Cannon, M. C., Beynon, J. L., Cannon,

Eckhardt, 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, nifB and nifC genes of Klebsiella pneumoniae and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (nif) gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 186: 514-524.

Espin, G., Morett, E., Moreno, S. (1984). Methionine Sulfoximine sensitive (MS-s) mutations that impair nitrogen fixation in Rhizobium phaseoli. In: *Advances in nitrogen fixation research*. Veeger, C., Newton, W. E. (eds.), The Hague Nijhoff/Junk Pudoc, p. 708.

Fuchs, R. L., Keister, D. L. (1980a). Identification of two glutamine synthetase in Agrobacterium. *J. Bacteriol.* 141: 996-998.

Fuchs, R. L., Keister, D. L. (1980b). Comparative properties of glutamine synthetases I and II in Rhizobium and Agrobacterium Spp. *J. Bacteriol.* 144: 641-648.

Gaillardin, C. M., Magasanik, B. (1978). Involvement of the product of the glnF gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in Klebsiella aerogenes. *J. Bacteriol.* 133: 1329-1338.

Garcia, E., Bancroft, S., Rhee, S. G., Kustu, S. (1977). The product of a newly identified gene, glnF, is required for synthesis of glutamine synthetase in Salmonella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1662-1666.

Guiney, D. G., Helinski, D. R. (1979). Molecular nature of two non-conjugative plasmids carrying drug resistance genes. *J. Bacteriol.* 117: 619-630.

Guterman, S. K., Roberts, G., Tyler, E. (1982). Polarity in the glnA operon: Suppression of the Reg phenotype by rho mutations. *J. Bacteriol.* 150: 1314-1321.

Hernalsteens, J. P., De Greve, H., Van Montagu, M., Schell, J. (1978). Mutagenesis by insertion of the drug resistance transposon Tn7 applied to Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens. *Plasmid* 1: 218-225.

Hill, S., Kennedy, C., Kavanagh, E., Goldberg, R. B., Hanau, R. (1981). Nitrogen fixation gene (nifH) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae. Nature (London) 290: 424-426.

Kennedy, C., Cannon, F., Cannon, M., Dixon, R., Hill, S., Jennsen, J., Kumar, S., Mac Lean, P., Merrick, M., Robinson, R., Postgate, J. (1980). Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. Australian Academy of Sciences, Canberra. pp 146-156.

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

Kustu, S., McKereghan, K. (1975). Mutations affecting glutamine synthetase activity in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 122: 1006-1016.

Kustu, S., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L., McFarland, N. (1979). Nitrogen control in Salmonella: Regulation by the glnR and glnF gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4576-4580.

Leemans, J., Soberon, G., Cevallos, M. A., Fernandez, L., Pardo, M. A., de la Vega, H., Flores, M., Quinto, C., Palacios, R. (1984). General organization of Rhizobium phaseoli nif plasmids. In: Advances in nitrogen fixation research. Veeger, C., Newton, W. E. (eds.), Nijhoff/Junk. Pudoc p. 710.

Leonardo, J. M., Goldberg, R. B. (1980). Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol. 142: 99-110.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

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

Ludwig, R. (1980). Regulation of Rhizobium nitrogen fixation by the unadenylated glutamine synthetase I system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 5817-5821.

MacNeil, D., Zhu, J., Brill, W. J. (1981). Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae: Isolation and characterization of strains with nif-lac fusions. J. Bacteriol. 145: 348-357.

MacNeil, T., MacNeil, D., Taylor, B. (1982). Fine-structure

deletion map of the glnA-glnL-glnG region in Escherichia coli. J. Bacteriol. 150: 1302-1323.

McFarland, N., McCarter, L., Artz, S., Kustu, S. (1981). Nitrogen regulatory locus "glnR" of enteric bacteria is composed of cistrons ntxB and ntxC: Identification of their protein products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 2135-2159.

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

Martinez, E. (1983). Limitantes para la aplicacion de la investigacion sobre fijacion biologica de nitrogeno a la agricultura. Tesis para obtener el grado de Maestro en Investigacion Biomédica Básico. UACPYF CCH. Universidad Nacional Autónoma de México.

Merrick, M., Hill, S., Hennecke, H., Hahn, M., Dixon, R., Kennedy, C. (1982). Repressor properties of the nifL gene product in Klebsiella pneumoniae. Mol. Gen. Genet. 185: 75-81.

Merrick, M. (1983). Nitrogen control of the nif regulation in Klebsiella pneumoniae: Involvement of the ntxA gene and analogies between ntxC and nifA. EMBO J. 2: 39-44.

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

Nuti, M. F., Ledboer, A. M., Lepidi, A. A., Schilperoort, R. A. (1977). Large plasmids in different Rhizobium species. J. Gen. Microbiol. 100: 242-248.

Nuti, M. F., Lepidi, A. A., Parakash, R. K., Shilperoort, R. A., Cannon, F. C. (1979). Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous Rhizobium plasmids. Nature (London). 282: 533-535.

Osorio, A. V., Servin, L., Rocha, M., Covarrubias, A., Bostarrachea, F. (1984). cis-dominant, glutamine synthetase constitutive mutations of Escherichia coli independent of activation by the glnG and glnF products. Mol. Gen. Genet. 194: 114-123.

Ow, D. W., Ausubel, F. M. (1983). Regulation of nitrogen metabolism genes by nifA gene product in Klebsiella pneumoniae. Nature (London) 301: 307-313.

Pagan, J. D., Child, J. J., Scowcroft, W., Gibson, A. (1975). Nature (London) 256: 406-407.

Pahel, G., Tayler, B. (1979). A new glnA regulatory gene for

glutamine synthetase in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4544-4548.

Pahel, G., Rothstein, D. M., Magasanik, B. (1982). Complex glnA, glnL, glnG operon in Escherichia coli. J. Bacteriol. 150: 202-213.

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: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction. Puhler, A. (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 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 (London) 299: 724-726.

Rigby, P. W. J., Dieckman, M., Hodess, C., Berg, P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113: 237-251.

Riley, M., Anilionis, A. (1978). Evolution of the bacterial genome. Ann. Rev. Microbiol. 32: 519-560.

Roberts, G. P., Brill, W. J. (1981). Genetics and regulation of nitrogen fixation. Ann. Rev. Microbiol. 35: 207-235.

Robertson, J. G., Farnden, K. J. F., Worburton, M. P., Banks, J. M. (1975). Induction of glutamine synthetase during nodule development in Lupin. Aust. J. Plant Physiol. 2: 265-277.

Robertson, J. G., Farnden, K. J. F. (1980). Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. In: Biochemistry of Plants. Miñlin, B. J. (ed). Academic press, New York. 5: 65-113.

Ruvkun, G., Ausubel, F. (1980). Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 191-195.

Sanchez, F., Ayala, A., Bosurto, R., Palacios, R., de la Vega, H., Quinto, C. (1984). Expression of symbiotic specific sequences in the Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris association. In: Advances in nitrogen fixation research. Veeger, C., Newton, W. E. (eds). The Hague Nijhoff/Junk Pudoc. p 698.

Shanmugam, K. T., Morandi, C. (1976). Amino acids as repressors of nitrogenase biosynthesis in Niebsiella pneumoniae. Biochim. Biophys. Acta. 437: 322-332.

Simon, R., Prierer, U., Fuhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/technology* 1: 784-791.

Soberon, G. (1983). Papel de los plásmidos indígenas de Rhizobium phaseoli en el proceso de nodulación. Tesis para obtener el grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica. UACFP CCH. Universidad Nacional Autónoma de México.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-518.

Sundaresan, V., Jones, J. D. G., Ow, D. W., Ausubel, F. (1983). Klebsiella pneumoniae nifA product activates the Rhizobium meliloti nitrogenase promoter. *Nature (London)*. 301: 728-732.

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

Tubb, R. S., Postgate, J. R. (1973). Control of nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae. *J. Gen. Microbiol.* 79: 103-107.

Verma, D. P. S., Long, S. (1983). The molecular biology of Rhizobium-legume symbiosis. En: International review of cytology. Suppl. 14. Jeon, K. (ed.). Academic press N. Y. 211-245.

Wacek, T., Brill, W. J. (1976). Simple, rapid assay for screening nitrogen fixing ability in soy-been. *Crop. Sci.* 16: 519-522.

Winter, H. C., Burtis, R. H. (1976). Nitrogenase. *Ann Rev. Biochem.* 45: 409-426.

Winttenberg, J. B., Bergersen, F. J., Appleby, C. A., Turner, G. L. (1974). Facilitated oxygen diffusion. *J. Biol. Chem.* 249: 4057-

Zimmerman, J. L., Szeto, W. W., Ausubel, F. M. (1983). Molecular characterization of Tn5-induced symbiotic (Fix-) mutants of Rhizobium meliloti. *J. Bacteriol.* 156: 1025-1036.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la M en C Guadalupe Espín O. en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Para la elaboración de esta tesis, conté con el apoyo de una beca otorgada por la Universidad Nacional y otra beca de hospedaje y alimentación por parte del CIFN.

El presente trabajo forma parte de un proyecto conjunto realizado con Guadalupe Espín y Soledad Moreno, a las que agradezco su valiosa colaboración brindada a lo largo de el desarrollo de esta tesis.

A mis sinodales, Alejandra Covarubias, Romilio Espejo, Rafael Palacios, Jaime Mora y Guadalupe Espín, por las invaluable discusiones que hemos sostenido, así como por haber accedido a revisar este trabajo.

A mis maestros, Antonio Velázquez, Jaime Mora, Romilio Espejo, Rafael Palacios y Guadalupe Espín, por el gran interés mostrado en mi formación académica.

A Marco, Mario y Lorenzo, por haber compartido la experiencia de esta carrera.