

03062
5
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE
NITROGENO

"IDENTIFICACION DE LOS GENES ESTRUCTURALES
gltBD DE LA GLUTAMATO SINTASA (GOGAT) Y LA
CARACTERIZACION DE UNA MUTANTE EN GOGAT
DE *Rhizobium etli*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
ADRIANA CASTILLO VILLANUEVA

ASESOR: DR. JAIME MORA CELIS.

CUERNAVACA, MOR.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

261279



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.

*Aprendamos a volar poco a poco, la paciencia y
tenacidad nos llevarán a alcanzar nuestros
ideales.*

*Dedico esta tesis para ti BEBE porque con tu presencia me has permitido ver y
sentir muchas cosas en forma diferente, con todo mi amor.*

*A mis papás por su apoyo y comprensión en todo momento, gracias por estar
conmigo, con admiración y cariño.*

*A Niels por su paciencia , comprensión y amistad, pero sobre todo por su compañía
y motivación en todo momento, mi admiración y mi amor.*

*A mis hermanos: Rey, Ale, Beto, César y Lore porque me han enseñado que estando
juntos es más fácil salir adelante y porque cuanto más pasa
el tiempo más los quiero y admiro.*

A mis sobrinas: Anilú, Lulú y Marifer, por su presencia siempre inspiradora.

*A mi sobrino y ahijado: Aldi porque me ha regalado momentos inolvidables siempre
llenos de amor e inocencia.*

A mi gran familia.

Con especial gratitud al Dr. Jaime Mora por su amistad y apoyo incondicional en mi formación personal y académica, gracias.

A mis tutores los Dres. Jaime Mora, Georgina Hernández, Guillermo Dávila, por su asesoría durante el desarrollo de este trabajo, y especialmente a los Drs. Alberto Mendoza y Brenda Valderrama porque además de su asesoría me brindaron su amistad.

A los Dres. Alicia González, Guadalupe Espín, Roberto Hernández y Brenda Valderrama por sus comentarios en la revisión de la tesis.

A Alfredo y Pepe porque a parte de ser mis cuñados son mis amigos.

A Yolanda Mora por ayudarme en la redacción de esta tesis, por su apoyo y amistad.

A mis compañeros y amigos: Ernesto, Sergio, Carmen, Mere, Humberto, Sandra, Juan, Victor, Mario y Pedro por los momentos compartidos.

Y a todas aquellas personas que sin su ayuda y compañía no hubiera sido posible desarrollar este trabajo, en especial a Jose Luis, Nacho, Patricia B., Sandra, Alfonso y Araceli.

Este trabajo fué desarrollado bajo la dirección del Dr. Jaime Mora en el Departamento de Ecología Molecular del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. Cuernavaca, Morelos.

Durante el desarrollo de este trabajo conte con beca de CONACyT, así como con un complemento del Departamento de Ecología Molecular y apoyo del SNI como ayudante de investigador.

INDICE

Capítulo I	pag
INTRODUCCION	
Metabolismo Nitrogenado	1
Asimilación de amonio	2
Glutamina sintetasa	3
Glutamato deshidrogenasa	4
Glutamato sintasa	5
Asimilación de amonio en <i>Rhizobium</i>	7
Estructura de la glutamato sintasa	9
Organización de los genes <i>glxBD</i>	11
Regulación de la síntesis de GOGAT	14
Capítulo II	
Relación simbiótica entre leguminosa- <i>Rhizobium</i>	17
Proceso de nodulación	17
Fijación de nitrógeno	18
Principales productos de nitrógeno fijado exportados de los nódulos	19
Papel de la asimilación de amonio de <i>Rhizobium</i> en la fijación simbiótica de nitrógeno	21
ANTECEDENTES DIRECTOS	22
MATERIALES Y METODOS	24
RESULTADOS	31
1) Caracterización genética del operón <i>glxBD</i> de <i>R. etli</i>	31
2) Caracterización fisiológica de la mutante TAD12	54
3) Caracterización simbiótica de la mutante TAD12	57
DISCUSION	70
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFIA	80

CAPITULO I

INTRODUCCION

Metabolismo nitrogenado.

A nivel celular, el metabolismo del nitrógeno está ligado con el metabolismo del carbono: la energía es dirigida hacia la síntesis de glutamato y glutamina con lo cual los esqueletos de carbono son transformados en nitrógeno orgánico (Mora, 1990).

En el caso de las bacterias, estas pueden utilizar un amplio rango de compuestos nitrogenados como única fuente de nitrógeno. Este rango va desde simples compuestos inorgánicos como dinitrógeno y nitrato hasta compuestos complejos incluyendo aminoácidos. Las vías metabólicas asimilatorias del metabolismo nitrogenado pueden ser divididas en dos clases: las que sirven para la utilización del nitrógeno del medio extracelular y las biosintéticas, ambas necesarias para la producción intracelular de compuestos nitrogenados. La combinación precisa de estas vías depende del organismo, pero en la mayoría de los casos la síntesis coordinada de las enzimas del metabolismo nitrogenado responden principalmente a las pozas intracelulares de metabolitos nitrogenados (Merrick y Edwards, 1995).

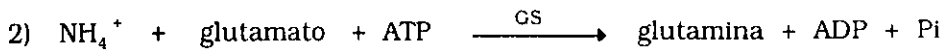
En bacterias entéricas, todo el nitrógeno celular para la síntesis de macromoléculas es derivado del grupo amido de la glutamina y del grupo amino del glutamato (Reitzer y Magasanik, 1987). Directamente o indirectamente, el glutamato provee los grupos α -amino para todos los demás aminoácidos, la mitad del nitrógeno para las pirimidinas, purinas y el anillo imidazol, así como para el grupo amino de la adenina. La glutamina, considerada un donador de nitrógeno de alta energía, provee el nitrógeno para los aminoazúcares, para el ácido nicotínico del NAD y p-aminobenzoato, los nitrógenos restantes para purinas y pirimidinas y además para los anillos aromáticos de los aminoácidos histidina y triptofano (Reitzer, 1996).

ASIMILACION DE AMONIO

Vías de asimilación de amonio.

Virtualmente en todas las células, la glutamina y el glutamato sirven como la llave donadora de nitrógeno para las reacciones biosintéticas. Existen dos vías principales para la incorporación del nitrógeno dentro de la glutamina y glutamato. La vía más importante es la glutamina sintetasa (GS)/glutamato sintasa (GOGAT), en donde la GS cataliza la síntesis de glutamina a partir del glutamato y del amonio para lo cual consume una molécula de ATP, mientras que la GOGAT transfiere el grupo amido de la glutamina al 2-cetoglutarato para producir dos moléculas de glutamato oxidando una molécula de NADPH. La ruta alternativa de asimilación es mediante la glutamato deshidrogenasa (GDH), en donde la aminación reductiva del 2-cetoglutarato por amonio da una molécula de glutamato, en una reacción dependiente de NADPH (Merrick y Edwards, 1995).

De esta manera, en *E. coli* y otras enterobacterias, las reacciones responsables en la asimilación de amonio (1), la síntesis de glutamina (2) y glutamato (3) son:



Las enzimas de la asimilación de amonio

Dependiendo de la concentración de amonio es que una u otra vía lleva a cabo la asimilación: cuando la concentración de amonio en el medio es alta (mayor de 1 mM) el amonio es incorporado directamente en glutamato y glutamina. Sin embargo, cuando la concentración del amonio del medio es menor de 0.1 mM, la única enzima que puede incorporarlo es GS por su alta afinidad por este compuesto (Reitzer y Magasanik, 1987; Osburne y Signer.

1980; Wakisaka *et al.*, 1989). Así mismo, cuando no hay amonio en el medio, éste debe obtenerse por el catabolismo de compuestos nitrogenados orgánicos como aminoácidos; el crecimiento del organismo en estas fuentes alternativas de nitrógeno no siempre es óptimo por lo que se dice que estos cultivos están limitados de nitrógeno. En condiciones de limitación de nitrógeno, la síntesis de GS se induce y capta más amonio, el mismo sistema que regula la transcripción de GS también controla la síntesis de las enzimas catabólicas y sistemas de transporte de estas fuentes de nitrógeno orgánico. Este sistema de regulación transcripcional inducido por la limitación de nitrógeno está compuesto por las proteínas NtrB y NtrC, el cual se conoce como regulon Ntr (Castaño, tesis de doctorado 1990).

Glutamino sintetasa.

La reacción catalizada por la GS es la única ruta biosintética conocida para la síntesis de glutamina. Mutaciones en *glnA*, el gen estructural para GS, dan como resultado auxotrofia por glutamina (Magasanik, 1988). GS es una enzima compuesta por 12 subunidades iguales codificadas por *glnA* que forma parte del operón *glnAntrBC*, situado en el min 86 del mapa cromosómico de *E. coli*. Tanto la actividad enzimática, como la síntesis de GS, están sujetas a un control en cascada jerarquizado y muy riguroso. Un primer mecanismo de control está dado por la inhibición acumulativa de la actividad enzimática por algunos productos del metabolismo de la glutamina (Ginsburg y Stadtman, 1973). El segundo nivel de su regulación es la adenilación reversible de un grupo tirosilo de cada subunidad de GS en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en el medio. La enzima va perdiendo actividad a medida que aumenta su grado de adenilación (Ginsburg y Stadtman, 1973; Magasanik, 1982). El sistema enzimático que cataliza la adenilación y desadenilación de GS es bastante complejo y también interviene en la regulación a nivel de la transcripción no sólo de GS, sino de las demás enzimas sujetas a control por Ntr (Magasanik, 1982). En contraste con la mayoría de los procariotes, el género de *Rhizobium*, tiene dos o tres genes específicos que codifican para diferentes GS's (Shatters *et*

al., 1993). En *R. etli* GSI y GSII (de Bruijn *et al.*, 1989; Darrow y Knotts, 1977), aparentemente funcionan bajo diferentes condiciones nutricionales (Bravo y Mora, 1988). La actividad de GSI es inducida cuando los organismos crecen en medio rico y la actividad de GSII es inducida y regulada por el nitrógeno en medio mínimo (MM) (Bravo y Mora, 1988). Una tercera GS ha sido reportada en rhizobáceas, pero las condiciones fisiológicas para su inducción no han sido determinadas (de Bruijn *et al.*, 1989; Carlson *et al.*, 1987; Espín *et al.*, 1990).

Fenotipo de cepas que carecen de GDH, GOGAT o ambas.

Siguiendo con la caracterización de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio para bacterias entéricas, cepas con mutaciones que dan como resultado la pérdida simultánea de actividad de las enzimas GDH y GOGAT generan auxotrofia por glutamato (Berberich, 1972). Esta auxotrofia puede ser satisfecha por glutamato o por otro compuesto que pueda donar su nitrógeno vía transaminación con 2-oxoglutarato, como por ejemplo aspartato (Reitzer, 1996). Una cepa que carece de la actividad de GDH no presenta un fenotipo detectable (Vender y Rickenberg, 1964), sin embargo, tiene una desventaja competitiva en medios limitados de energía (Helling, 1994). La GDH de *E. coli* ha sido purificada: es un hexámero de subunidades idénticas codificadas por el gen *gdhA*, mapeado en el min 38.6 (Helling, 1990). Se regula a nivel transcripcional y quizá también a nivel postranscripcional por glutamato y aunque el mecanismo de represión no ha sido estudiado, se sabe que el glutamato exógeno reduce la transcripción (Reitzer, 1996; Riba *et al.*, 1988). Igualmente, ha sido reportado que la limitación de carbono reprime la síntesis de GDH: un sitio de unión de CRP (Cyclic AMP Receptor Protein) se sobrelapa con el promotor de *gdhA*, sugiriendo que reprime la transcripción de este gene. Esta forma de regulación podría servir para prevenir la utilización del 2-cetoglutarato formado a partir del ciclo del ácido cítrico durante los crecimientos limitados de carbono (Reitzer, 1996; Riba *et al.*, 1988).

En contraste, una cepa carente de GOGAT tiene un fenotipo más severo, dado que sólo puede sintetizar glutamato por GDH si la concentración de amonio es mayor de 1 mM (Tyler, 1978), no puede crecer en medios conteniendo bajos niveles de amonio o una fuente de nitrógeno la cual genere amonio a niveles limitantes (Berberich, 1972). Adicionalmente se han descrito mutaciones que afectan la síntesis de GOGAT, tanto en *E. coli* (Pahel *et al.*, 1978) como en *Klebsiella aerogenes* (Brenchley *et al.*, 1973) y en *Salmonella typhimurium* (Madonna *et al.*, 1985). Todas ellas simultáneamente confieren un fenotipo denominado *Asm⁻* que se refiere a la incapacidad del organismo para utilizar una variedad de compuestos nitrogenados (aminoácidos) como única fuente de nitrógeno (Pahel *et al.*, 1978).

Funciones de GDH y de GOGAT.

No ha sido fácil entender por qué bacterias como *E. coli* presentan dos vías para sintetizar glutamato, sin embargo, los parámetros cinéticos de las enzimas, los diferentes niveles enzimáticos bajo diferentes condiciones de crecimiento y las propiedades de las mutantes múltiples muestran que la vía de GOGAT presenta al menos dos roles para los cuales GDH no puede sustituirla: 1) puede fijar amonio dentro de moléculas orgánicas (glutamato y de ahí otros compuestos) cuando la concentración externa de amonio es baja y 2) reduce la concentración de la glutamina cuando ésta se acumula (Reitzer y Magasanik, 1987).

Estudios de competencia entre las dos vías realizados por Helling (1994) sugieren que los principales factores en determinar cuando GS, GDH y GOGAT participan en la asimilación de amonio son la disponibilidad y la calidad de la energía y del nitrógeno. GDH es importante para células creciendo en medio escaso en energía y abundante en nitrógeno. Por el contrario, para células creciendo en medio abundante en energía pero escaso en nitrógeno (menor de 1mM de amonio u otra fuente de nitrógeno) las enzimas que participan en este proceso son GS y GOGAT.

Dado que se requiere alrededor de ocho veces más glutamato que glutamina para la biosíntesis celular, durante el crecimiento en un medio conteniendo bajas concentraciones de amonio o alguna otra fuente de nitrógeno, o sea, cuando el amonio es asimilado exclusivamente por la GS en glutamina, la mayoría de ésta debe ser reciclada a glutamato. Esto significa que las amidotransferasas dependientes de glutamina que convierten la glutamina en glutamato entran en actividad, pero solo aproximadamente el 12% del glutamato celular producido durante crecimientos limitados de amonio es provisto por otras amidotransferasas diferentes de GOGAT, la cual produce el 88% restante del glutamato celular (Reitzer y Magasanik, 1987). Una cepa silvestre de *E. coli* podrá crecer en una concentración de amonio de alrededor de 0.1 mM como fuente de nitrógeno, pero mutantes en GOGAT no alcanzan a crecer en la ausencia de glutamato externo aunque la GDH esté presente (Pahel *et al.*, 1978). Esto es porque la K_m de GDH por amonio (alrededor de 3 mM) es baja con relación a la de GS (<0.2 mM) (Miller y Stadtman, 1972) y porque mutantes en GOGAT son incapaces de incrementar los niveles de la glutamino sintetasa en respuesta a una limitación de nitrógeno (Servín-González y Bastarrachea, 1984; Magasanik, 1982).

En resumen, para asimilar amonio las células requieren la actividad de la glutamino sintetasa (GS), siendo ésta una enzima clave en la regulación del flujo del nitrógeno en la célula. Su función está acoplada con la actividad de la glutamato sintasa (GOGAT) y de esta manera se forma un ciclo (Fig. 1) que permite asimilar amonio a partir de la molécula de glutamina así como la recuperación y mantenimiento de un adecuado nivel intracelular de glutamato. La actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH) es dispensable cuando el medio es abundante en energía pero escaso en nitrógeno (Reitzer y Magasanik, 1987; Elmerich *et al.*, 1992).

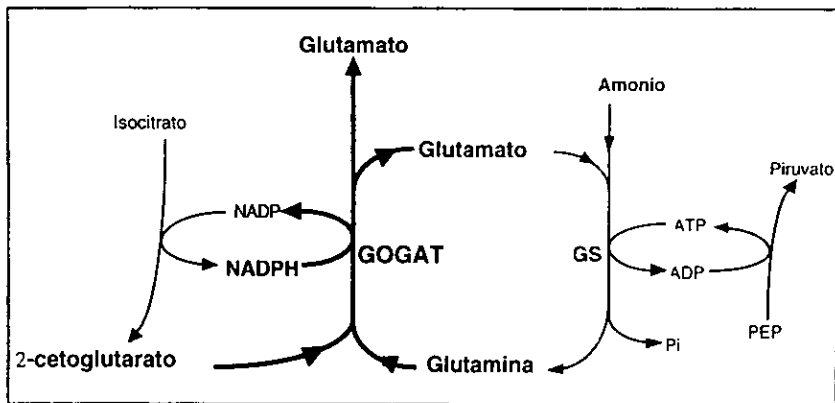


Figura 1. Síntesis de glutamato a partir de amonio y 2-cetoglutarato en el ciclo de asimilación GS/GOGAT en bacterias entéricas

Asimilación de amonio en bacterias del género *Rhizobium*.

En contraste con los microorganismos que utilizan la vía de asimilación de amonio GDH-GS cuando crecen en exceso de amonio, virtualmente todos los microorganismos que fijan nitrógeno atmosférico en vida libre asimilan amonio a través de la vía GS/GOGAT (Kanamori *et al.*, 1989). Todas las especies de *Rhizobium* caracterizadas hasta ahora carecen de una actividad funcional de GDH y dependen completamente de la vía GS/GOGAT para la asimilación de amonio en vida libre y durante la simbiosis (Bravo *et al.*, 1988; Kondorosi *et al.*, 1977; O'Gara *et al.*, 1984) La vía GS/GOGAT presenta una alta afinidad por amonio, dado que GS tiene una K_m más baja por este sustrato que GDH. Utilizar esta vía podría beneficiar al organismo porque el amonio que se deriva del nitrógeno fijado está presente en cantidades limitadas (Mendoza *et al.*, 1995).

Los estudios realizados por Kondorosi *et al.* (1977) con la cepa 41 de *R. meliloti*, demostraron que GS y GOGAT están presentes en altos niveles

cuando las células crecen en medios conteniendo diferentes concentraciones de amonio. No detectaron actividad de GDH, aún en aquellas células creciendo en altas concentraciones de amonio. Por otro lado, todos los auxótrofos de glutamato obtenidos carecen de GOGAT lo cual indica que la única vía de asimilación es la de GS/GOGAT. Como una evidencia de la ausencia de GDH en *R. meliloti*, una cepa GOGAT⁻ es similar a una doble mutante GOGAT⁻ GDH⁻ de *Klebsiella pneumoniae* (Shanmugtam y Morandi, 1976) la cual no puede utilizar amonio como única fuente de nitrógeno, en contraste con la mutante sencilla GOGAT⁻ (Asm⁻) de *K. pneumoniae* que sí puede utilizar al amonio (Nagatani *et al.*, 1971).

Estudios similares a los anteriores realizados con la cepa CJ1 de *Bradyrhizobium japonicum* demostraron que ésta presenta actividades de GS y GOGAT pero no actividad de GDH (O'Gara *et al.*, 1984). La caracterización de una cepa auxótrofa de glutamato demostró que carece de la actividad de GOGAT, pero conserva niveles de GS similares a los detectados en la cepa silvestre (O'Gara *et al.*, 1984).

En la cepa ORS571 de *Azorhizobium sesbaniae* la asimilación de amonio se lleva a cabo a través de la vía GS/GOGAT, de ahí que una mutante Asm⁻ defectuosa en GOGAT no pueda controlar las pozas intracelulares de glutamina-glutamato por periodos largos. Esta cepa aún convierte el amonio generado por el catabolismo de aminoácidos en glutamina, sin embargo, esta glutamina no puede ser convertida a glutamato con una asimilación neta de nitrógeno y por lo tanto las pozas de glutamina se incrementan. Adicionalmente, en esta mutante GOGAT utiliza tanto el NADH como el NADPH como fuente de poder reductor (Donald y Ludwig, 1984).

En *R. etli*, [anteriormente denominada *R. phaseoli* o *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Segovia *et al.*, 1993)] también se ha reportado que la única vía de asimilación es la de GS/GOGAT, que no presenta una actividad de GDH (Bravo y Mora, 1988) y que tiene tres formas de GS's: GS I que es similar a las encontradas en otras bacterias como *E. coli* (Darrow, 1980), GS II que tiene un peso molecular más bajo y es similar a la de eucariotes (Ludwig,

1980) y GSIII que tiene un peso molecular y una estabilidad similar a GSI (Espin *et al.*, 1990).

Estructura de la Glutamato Sintasa.

La enzima GOGAT está presente en bacterias, algas, hongos y plantas superiores. En *E. coli*, GOGAT [L-glutamina:2-oxoglutarato amido-transferasa; EC 2.6.1.53] es una flavoproteína que contiene hierro y azufre, está compuesta de cuatro dímeros que consisten de dos subunidades diferentes, con pesos moleculares aproximadamente de 166 kDa (1514 aa) y 52 kDa (417 aa), respectivamente (Oliver *et al.*, 1987). Estas subunidades son purificadas *in vivo* como un oligómero $\alpha_4 \beta_4$ de aproximadamente 800 kDa (Trotta *et al.*, 1974). Los polipéptidos son codificados por los genes *gltB* para la subunidad grande y *gltD* para la subunidad chica, los cuales han sido clonados y secuenciados (Garcíarrubio *et al.*, 1983; Oliver *et al.*, 1987).

La reacción catalizada por GOGAT ocurre en dos pasos: la reducción por NADPH de la flavina unida a la enzima, seguida por la reacción de la flavina reducida con el 2-cetoglutarato y glutamina para generar flavina oxidada y dos moléculas de glutamato (Miller y Stadtman, 1972; Rendina y Orme-Johnson, 1978). Del análisis bioquímico y del mecanismo de reacción de las subunidades se propone un esquema de reacción general para esta enzima: el NADPH se une a la subunidad pequeña y transfiere los electrones a la subunidad grande, lo cual reduce la flavina. El 2-cetoglutarato se une a la subunidad pequeña y la glutamina se une a la subunidad grande. El amido de la glutamina es transferido al 2-cetoglutarato y la flavina reducida reduce a su vez un intermediario propuesto (iminoglutarato) a glutamato. Este mecanismo de reacción implica que ambas subunidades son necesarias para la actividad catalítica y ésto es consistente con la evidencia genética (Reitzer, 1996).

Como se mencionó, las NADPH-GOGATs de bacterias (Trotta *et al.*, 1974; Adachi y Suzuki, 1977; Hemmilä y Mäntsälä, 1978; Oliver *et al.*, 1987) están compuestas de dos subunidades diferentes. En contraste, las GOGATs de plantas superiores estudiadas hasta ahora (Suzuki y Gadal, 1984;

Anderson *et al.*, 1989; Chen y Cullimore, 1989), así como las de *Chlamydomonas reinhardtii* (Cullimore y Sims, 1981), de *Saccharomyces cerevisiae* (Cogoni *et al.*, 1995) y de *Neurospora crassa* (Hummelt y Mora, 1980), consisten de un sólo gene que codifica para un polipéptido.

Basados en la secuencia de N-terminal de la subunidad grande de GOGAT en *E. coli*, se propone que el término de esta subunidad madura es creada por una ruptura proteolítica en un cisteína y un precursor cuya traducción empieza en el residuo de metionina (Oliver *et al.*, 1987). Para *Medicago sativa*, *Zea mays* (Gregerson *et al.*, 1993) y *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito la presencia de la presecuencia de residuos de aminoácidos que, para el caso de alfalfa se sugiere que es requerida para el transporte hacia los organelos y para *Saccharomyces cerevisiae* se propone que es requerida para tener una reserva de la enzima inactiva en la célula que puede ser rápidamente activada por proteólisis (Filetici *et al.*, 1996).

En plantas superiores, la GOGAT se encuentra como dos formas distintas que difieren en su peso molecular, cinética, localización dentro de la planta y la especificidad del poder reductor: NADH-GOGAT y ferredoxina-GOGAT (Lea *et al.*, 1990; Suzuki y Gandal, 1984). Los genes que codifican para la NADH-GOGAT de alfalfa (*Medicago sativa*, Gregerson *et al.*, 1993), Fd-GOGAT de maíz (*Zea mays*, Sakakibara *et al.*, 1991) y NADH-GOGAT de *Saccharomyces cerevisiae* (Filetici *et al.*, 1996) han sido clonados y la comparación de su secuencia de aminoácidos con las dos subunidades de NADPH-GOGAT de *E. coli* revela regiones altamente conservadas (Fig. 2) (Gregerson *et al.*, 1993; Filetici *et al.*, 1996).

En *Pyrococcus* sp. KOD1, una arqueobacteria hipertermofílica, el gen *gltA* que codifica para GOGAT fue clonado en un fragmento *HindIII-BamHI* de 6.6 Kb y el análisis de secuencia indica que codifica para una proteína de 481 aminoácidos, que presenta regiones conservadas similares a la subunidad pequeña de la GOGAT de bacterias. Sin embargo, no hay similitud con la subunidad grande. El gen *gltA* fue sobreexpresado en *E. coli* y se encontró que es funcional como un homotetrámero de aproximadamente 205 kDa, lo que indica que esta GOGAT es la GOGAT activa más pequeña que

se conoce, siendo también dependiente de NADPH (Jongsareejit *et al.*, 1997).

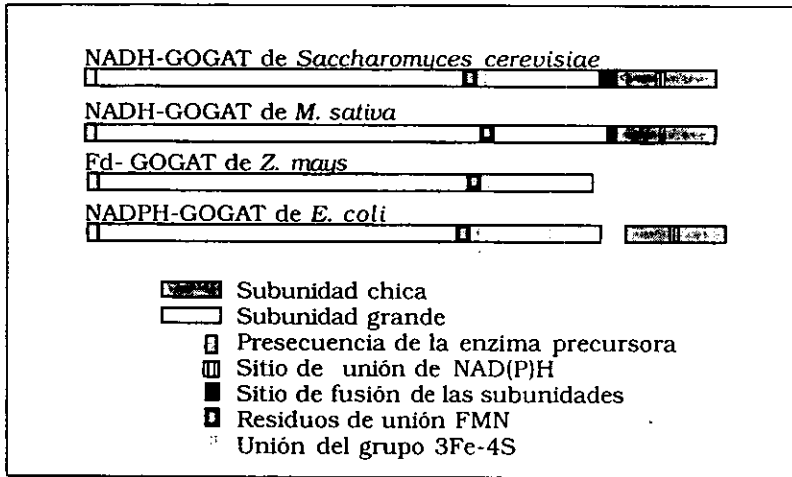


Figura 2. Diagrama de comparaciones de proteínas conocidas de GOGAT.

Organización de los genes que codifican para GOGAT en diferentes especies bacterianas.

En *E. coli*, al igual que en *Salmonella typhimurium* (Madonna *et al.*, 1985), el locus que codifica para GOGAT está localizado en el min 68 del mapa cromosómico (Pahel *et al.*, 1978) y está contenido en un fragmento de DNA de 6.3 kb *HpaI-EcoRI* (Garcíarrubio *et al.*, 1983). Los primeros estudios realizados con este fragmento revelaron que los genes estructurales de la GOGAT, *gltB* y *gltD* forman un operón y se cotranscriben en ese orden (Garcíarrubio *et al.*, 1983). Sin embargo, estudios más recientes han descrito que el operón está formado por cuatro genes: los genes estructurales *gltB* y *gltD*, *gltF* y un cuarto ORF (Fig. 3a; Castaño *et al.*, 1992).

El primer gen es *gltB* de aproximadamente 4.5 kb, seguido de *gltD* de 1.4 kb, los cuales codifican para la subunidad grande y chica de GOGAT, respectivamente. El tercer gen es *gltF* el cual codifica para una proteína con una peso molecular predicha de 27 kDa y cuyo producto parece ser un mediador en la transcripción del mismo operón y también se requiere para la inducción de los genes Ntr (Castaño *et al.*, 1992). El cuarto gen codifica para un polipéptido con un peso molecular predicho de aproximadamente 24.6 kDa cuya secuencia de aminoácidos no presenta similaridad con ninguna proteína descrita hasta ahora (Castaño *et al.*, 1992). El principal promotor del operón precede a *gltB* (Oliver *et al.*, 1987) y existe la posibilidad de que este localizado un promotor secundario entre *gltB* y *gltD*, debido a que a través de plásmidos en los que se tiene subclonado el gen *gltD* en cualquier orientación con respecto al vehículo, es posible dirigir la síntesis de la proteína en un sistema de minicélulas (Garcíarrubio *et al.*, 1983).

Magasanik (1982) y Castaño *et al.* (1992) señalan que *gltF* puede estar involucrado en la regulación de Ntr, bajo condiciones limitantes de nitrógeno, por ejemplo, en la inducción de enzimas catabólicas responsables de la utilización de substratos tales como prolina o arginina, cuya degradación da amonio o glutamato en bajas cantidades. Por lo tanto, Castaño *et al.* (1992) concluyen que el operón *gltBDF* de *E. coli* está involucrado en la inducción de las llamadas enzimas Ntr en respuesta a deprivación de nitrógeno, al mismo tiempo que en la biosíntesis del glutamato.

En *Azospirillum brasilense*, las dos subunidades estructurales de GOGAT difieren de las de *E. coli* en su organización, ya que el operón contiene primero a *gltD* y después a *gltB* (Fig. 3b; Pelanda *et al.*, 1993). sin embargo, la secuencia de aminoácidos deducida de ambos genes presenta una alta similitud con los de *E. coli* (Pelanda *et al.*, 1993). En *Bacillus subtilis* los genes que codifican para ambas subunidades de GOGAT se encuentran separados en el genoma, al gene que codifica para la subunidad grande se le denomina *gltA* y *gltB* al que codifica para la subunidad pequeña (Bohannon *et al.*, 1985).

En *A. caulinodans* se aislaron y caracterizaron dos mutantes en GOGAT, con inserciones al azar del transposón Tn5, que sirvieron para la clonación del locus *glt*. Un fragmento de DNA de 12.3 kb que complementa la auxotrofia por glutamato contiene los genes estructurales para GOGAT. Este fragmento fue subclonado generando el plásmido pHB10, el cual hibridiza contra los genes *gltBD* de *E. coli* y es capaz de complementar el fenotipo Asm⁻ de una cepa *gltB31 gdh-1* de *E. coli* (PA340, Bachmann, 1972). No se caracterizó el locus por secuencia y no se reporta la organización del(l)os gen(es) (Hilgert *et al.*, 1987).

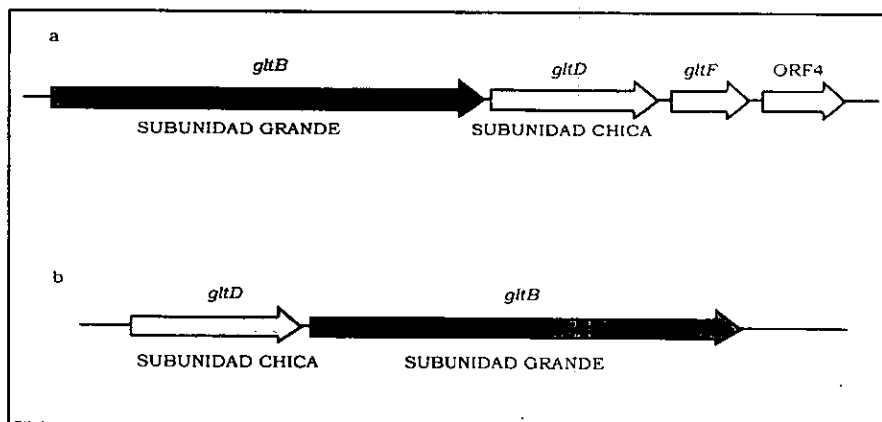


Figura 3. Organización del operón de los genes *gltBD* en a) *E. coli* y b) *A. brasilense*.

El locus *glt* de *Rhizobium meliloti* también se ha clonado y parcialmente caracterizado (Lewis *et al.*, 1990). Con el banco genómico de *R. meliloti* se llevó a cabo la complementación de la cepa doble mutante *gltB gdhA* de *E. coli* (PA340) y de la cepa GOGAT⁻ de *R. meliloti* (AK330; Kondorosi *et al.*, 1977) obteniéndose un cósmido de 25 kb que después se subclonó y se redujo a un fragmento de 6.1 kb que seguía complementando a

ambas cepas (Lewis *et al.*, 1990), pero no se llevo a cabo la secuencia nucleotidica de este fragmento.

Regulación de la síntesis de GOGAT.

Debido a que la GOGAT es una enzima clave en el metabolismo nitrogenado, no es sorprendente que un número importante de condiciones fisiológicas afecten el nivel estable de la GOGAT (Reitzer, 1996). En este sentido, cabe mencionar que hay dos aspectos de la GOGAT que son altamente conservados: 1) su actividad es alta en medios mínimos conteniendo amonio y 2) el glutamato u otras fuentes de nitrógeno que generan glutamato, tales como arginina, aspartato, histidina y prolina, reprimen su transcripción, dado que el crecimiento es limitado en nitrógeno (Miller y Stadtman, 1972). Aparentemente esta represión requiere de la inducción de la respuesta Ntr para el transporte eficiente y el subsecuente catabolismo de estos aminoácidos (Reitzer, 1996). De esta manera, un primer nivel de regulación de la síntesis de GOGAT se presenta con la presencia de GltF, producto del tercer gen del operón *gltBDF*, el cual participa en esta represión dependiente de glutamato (Castaño *et al.*, 1992). Para observar la represión producida por alto glutamato intracelular, es posible que *gltF* tenga un efecto indirecto, es decir, que el producto de este gen genere una señal (posiblemente por fosforilación) que produzca la represión. También pudiera ser que *gltF* directamente sea un represor del operón al que pertenece aunque esto es menos probable ya que el producto de *gltF* está aparentemente embebido en la membrana (Castaño, tesis de doctorado, 1990).

El crecimiento en medio rico también reprime la síntesis de GOGAT en bacterias entéricas. Es razonable suponer que el mismo mecanismo que media la represión por glutamato podría participar en esta regulación. sin embargo, al menos en *E. coli* está involucrada la proteína Lrp (leucine-responsive protein) la cual controla la expresión de por lo menos 30 proteínas que tienen un papel en la biosíntesis y el catabolismo de

aminoácidos (Ernsting *et al.*, 1992). Lrp regula positivamente operones involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y negativamente operones del catabolismo de aminoácidos y del transporte de peptidos, entre otros (Calvo y Matthews, 1994). Para la síntesis de GOGAT, Lrp es considerado un activador leucina-insensible, aunque Lrp interviene en una represión doble por leucina (Ernsting *et al.*, 1993). Lrp regula positivamente la transcripción de *gltBDF*, uniéndose con alta afinidad arriba del inicio de la transcripción de este operón (Ernsting *et al.*, 1993). La expresión del operón depende de la expresión que tenga Lrp en el medio de crecimiento, esto es, si Lrp tiene baja expresión en un medio rico, entonces los niveles de GOGAT también son bajos (Lin *et al.*, 1992).

La limitación de carbono en el medio de cultivo también regula moderadamente la síntesis de GOGAT. Estudios realizados en *E. coli* demostraron que la adición exógena de AMP cíclico reprime moderadamente la expresión de GOGAT en presencia de glucosa como fuente de carbono (Prusiner *et al.*, 1972). Una secuencia de unión a CRP se sobrelapa con el elemento -35 del promotor del operón *gltBDF*, sugiriendo un mecanismo de represión dependiente de CRP (Oliver *et al.*, 1987). Así, estos mecanismos de regulación pueden evitar que GOGAT gaste el 2-cetoglutarato del ciclo del ácido cítrico en condiciones de limitación de carbono y energía (Reitzer, 1996).

En resumen, existen factores fisiológicos que reducen o previenen la expresión de la GOGAT como son: el glutamato, los crecimientos en medios ricos o limitados en carbono y la presencia de leucina. Por otro lado, los factores que incrementan la síntesis de GOGAT son los crecimientos en medios mínimos conteniendo bajo amonio y las mutantes en *gltF*. También se ha reportado la existencia de dos reguladores, Lrp y CRP, como moduladores de la síntesis (Fig. 4) (Ernsting *et al.*, 1992; Oliver *et al.*, 1987; Reitzer, 1996).

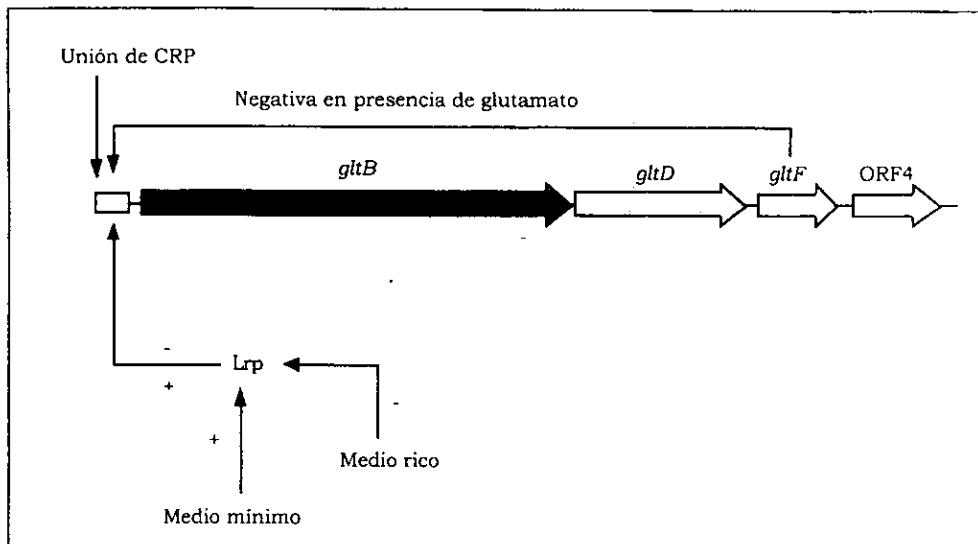


Figura 4. Regulación del operón *gltBDF* en *E. coli*.

Se ha descrito la presencia de proteínas similares a Lrp para otras bacterias como *Salmonella typhimurium* (Wang *et al.*, 1993) y se ha reportado que los genes *lrp* de tres microorganismos entéricos han sido clonados y secuenciados: *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella aerogenes* y *Salmonella typhimurium* (Friedberg *et al.*, 1995). El análisis de las secuencias de éstos presentan sólo pequeños cambios, lo cual sugiere que la secuencia de aminoácidos de la proteína Lrp está altamente adaptada para su función. Recientemente, en *Bradyrhizobium japonicum*, se ha identificado un gen *lrp* con un 58% de identidad con el de *E. coli* (King y O'Brian, 1997) y otro en *Bacillus subtilis*, el cual tiene un posible rol en la regulación del metabolismo de aminoácidos (Beloin *et al.*, 1997).

CAPITULO II

Relación simbiótica entre leguminosa-*Rhizobium*.

El nitrógeno es el nutriente limitante para el crecimiento de la mayoría de las plantas (Greenwood, 1982). Estas adquieren el nitrógeno del suelo en forma de nitrato, el cual se puede derivar de la atmósfera, provenir de la descomposición de materia orgánica o de la utilización de fertilizantes (Gregerson *et al.*, 1993). Anteriormente a su incorporación dentro de los compuestos orgánicos, el nitrato debe ser reducido a amonio a través de la acción de dos enzimas de la planta: la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. En contraste, algunas especies de plantas leguminosas obtienen su nitrógeno del dinitrógeno atmosférico, a través de formar una asociación simbiótica con microorganismos fijadores del género *Rhizobium*, los cuales convierten el dinitrógeno directamente a amonio (Gregerson *et al.*, 1993). A través de esta simbiosis, la planta es capaz de obtener parte o todo el nitrógeno requerido para su crecimiento (Shubert, 1986).

En esta relación de simbiosis hay un beneficio ecológico para ambos organismos (hospedero y simbiote), con un flujo bidireccional de carbono y nitrógeno. Antes de que la fijación de nitrógeno comience, la planta provee los substratos de carbono y nitrógeno para nutrir el crecimiento y desarrollo del nódulo. Una vez que la fijación comienza, los nódulos y bacteroides mantienen su dependencia con la planta (Schubert, 1986).

Proceso de nodulación.

La formación y función de la asociación simbiótica entre leguminosas y *Rhizobium* involucra un complejo grupo de adaptaciones que conducen a un intercalamiento de sus metabolismos y generan la necesidad de desarrollar mecanismos de control genético y bioquímico específicos (Schubert, 1986).

El proceso de nodulación inicia con la liberación de exudados por la planta que contienen flavonas y flavonoides y que sirven como quimio-atrayentes para las bacterias que están presentes en la rizósfera. La primera etapa es el contacto entre las células bacterianas y los pelos radicales de la planta: las células de *Rhizobium* se adhieren a los pelos radicales y en respuesta a esta unión los pelos radicales se deforman en forma de "cayado" que en su parte interna atrapa un grupo de bacterias. Inmediatamente abajo del sitio de adherencia, el hospedero deposita material propio de la pared celular de tal modo que la planta constituye una estructura tubular llamada hilo de infección. Los *Rhizobium* penetran a través del tubo, englobados en una membrana hasta el tejido nodular que se origina en el córtex de la raíz. Las bacterias se liberan del hilo de infección en las células del tejido nodular, quedando englobadas dentro de una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal. En este momento, la bacteria deja de multiplicarse, se transforma en bacteroide e inicia el proceso de fijación del nitrógeno. Al mismo tiempo la planta sintetiza una serie de proteínas, específicas de la simbiosis, llamadas nodulinas que están involucradas en el desarrollo, estructura, mantenimiento y funcionalidad del nódulo (Denarie y Roche, 1992; Rocha y De las Peñas, 1990).

Fijación de nitrógeno.

La reducción del nitrógeno molecular (dinitrógeno) a iones de amonio (NH_4^+) es una conversión que demanda altos niveles de energía y que solamente los organismos procarióticos tienen la capacidad de hacer. La fijación de nitrógeno por estos organismos consume una gran cantidad de energía en forma de ATP y requiere de poder reductor para la enzima responsable de esta reducción, que es la nitrogenasa. La enzima está codificada por los genes *nifK*, *nifD* y *nifH* de *Rhizobium*, que dependen de *NifA* para su expresión. La nitrogenasa es inhibida competitivamente por NH_4^+ en bacterias como *Klebsiella pneumoniae* que fijan nitrógeno en vida libre (Kennedy *et al.*, 1976) e inactivada por oxígeno. Sin embargo, el oxígeno es requerido por el bacteroide para la oxidación del fotosintato de

la planta y así poder generar los altos niveles de ATP consumidos en el proceso de fijación. En este sentido, la disponibilidad del oxígeno para los bacteroides es regulado por la planta en un proceso conocido como protección respiratoria, en el cual esta involucrada una proteína llamada leghemoglobina que transporta oxígeno y asegura el flujo suficiente de oxígeno para que se lleve a cabo el proceso de la fijación del nitrógeno (Appleby, 1984). Finalmente, el NH_4^+ es excretado a la planta para evitar la inhibición de la actividad de la nitrogenasa (Grierson y Covey, 1984).

Principales productos del nitrógeno fijado exportado de los nódulos.

Los iones de amonio, resultado de la reducción del nitrógeno por la nitrogenasa, son excretados *in vivo* (Robertson *et al.*, 1975) por los bacteroides dentro del citoplasma de las células del nódulo donde son asimilados y utilizados en la síntesis de metabolitos que contendrán nitrógeno orgánico para ser transportado a la planta. Estudios realizados por Meeks *et al.*, (1978) demostraron que el amonio es incorporado inicialmente a la posición amido de la glutamina en una reacción catalizada por la GS, que está localizada en el citoplasma y posteriormente el grupo amido es transferido al carbono- β del 2-cetoglutarato en una reacción de aminación reductiva catalizada por la GOGAT que puede estar presente tanto en el citoplasma como en el plástido (Awonaike *et al.*, 1981; Boland *et al.*, 1982). Así, a partir de estas dos reacciones, que dan como producto el glutamato y la glutamina, se sintetizan las moléculas que serán transportadas por la planta.

Los compuestos nitrogenados que se transportan a las plantas por el xilema se clasifican dependiendo de la composición del flujo que se colecta a través de la excisión de los nódulos o del sistema de la raíz nodulada, de esta manera, tenemos a los exportadores de amidas y a los exportadores de ureidos. Los exportadores amidos transportan asparagina (Asn), glutamina (Gln) o 4-metilenoglutamina (MeGln), mientras que los exportadores de ureidos transportan alantoina (Aln) y ácido alantóico (Alc) o citrulina (Cit) (Grierson y Covey, 1984; Schubert, 1986).

Leguminosas de la tribu Phaseoleae sintetizan y transportan ureidos: alantoína y ácido alantóico (Fig. 5). Estos dos compuestos conforman del 60 al 90% del nitrógeno total del xilema de soya (McClure e Israel, 1979; Streeter, 1979) y de frijol (Cookson *et al.*, 1980) entre otras leguminosas creciendo simbióticamente (Pate y Atkins, 1983).

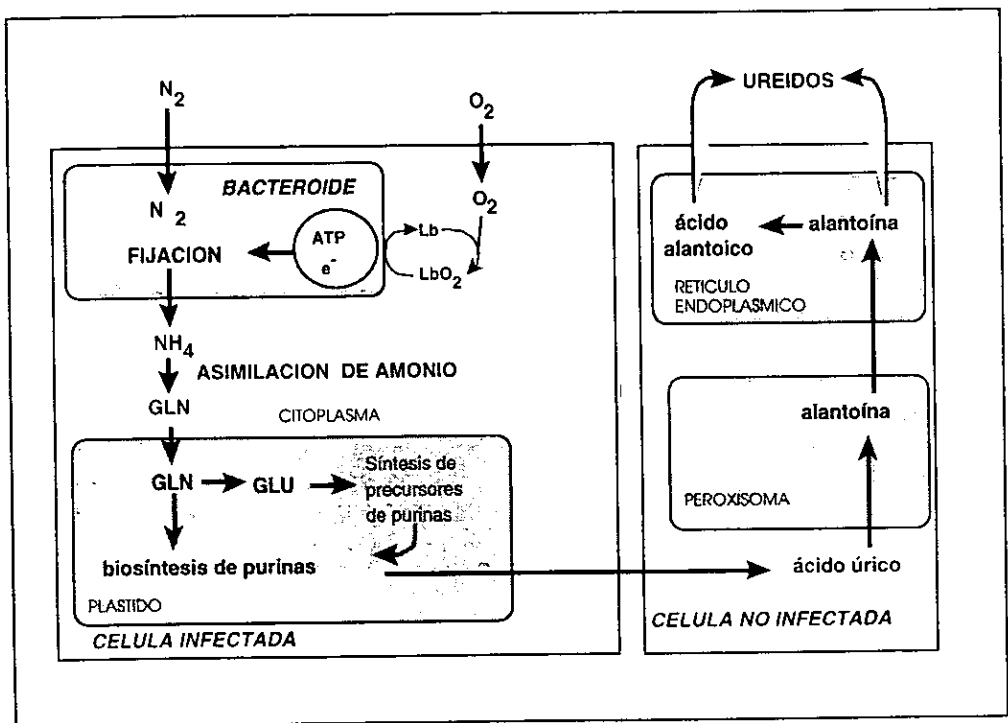


Figura 5. Modelo propuesto de la organización celular en la biogénesis de ureidos (Schubert, 1986)

Papel de la asimilación de amonio de *Rhizobium* en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Es aceptado generalmente que la asimilación de amonio no es funcional en *Rhizobium* cuando la bacteria está en simbiosis con plantas, de tal manera que todo el nitrógeno fijado es liberado hacia la planta en forma de amonio, esto se infiere a partir de que mutantes de *Rhizobium* que carecen de GS o de GOGAT no tienen un fenotipo simbiótico obvio (Osburne y Signer, 1980; de Bruijn *et al.*, 1989; Shatters *et al.*, 1989). Sin embargo, la actividad de GOGAT ha sido detectada en bacteroides de nódulos formados en diferentes especies de leguminosas (Brown y Dilworth, 1975). Además la actividad de GSI está presente en bacteroides de *R. etli* aislados de nódulos de frijol (Moreno *et al.*, 1991) y también hay evidencias para la síntesis de metabolitos nitrogenados en la bacteria durante la simbiosis (Salminen y Streeter, 1987).

En *R. meliloti*, la actividad de GOGAT y la habilidad de asimilar amonio no son aparentemente necesarias para una asociación simbiótica efectiva ya que una cepa GOGAT es incapaz de asimilar amonio pero es completamente efectiva en la nodulación y fijación de nitrógeno (Kondorosi *et al.*, 1977).

A diferencia de la cepa deficiente en GOGAT de *R. meliloti*, una cepa mutante en GOGAT de *B. japonicum* puede inducir la nodulación pero los nódulos son defectivos (O'Gara *et al.*, 1984). Para *A. caulinodans*, cepas identificadas con deficiencia en NADPH-GOGAT son defectivas tanto en la asimilación de amonio como en la fijación de nitrógeno en simbiosis (Donald y Ludwig, 1984).

En *R. etli*, estudios bioquímicos y genéticos han demostrados que sólo la actividad de GSI está presente en bacteroides durante la simbiosis y que cuando el gene que codifica para esta enzima es mutado, la actividad de reducción de acetileno en nódulos inducidos por esta mutante es el 50% de la encontrada en nódulos inducidos por la cepa silvestre (Moreno *et al.*, 1991).

ANTECEDENTES DIRECTOS

En el laboratorio estamos interesados en el estudio de la relación entre la asimilación de amonio y la fijación biológica del nitrógeno durante la simbiosis. Como modelo estudiamos la interacción de *R. etli* con frijol, ésta es la bacteria endosimbiótica más frecuentemente encontrada en asociación con plantas de frijol aisladas de la región central de México (Martínez *et al.*, 1985), Latinoamérica, España, Australia y Africa del Sur (Esperanza Martínez, comunicación personal).

Existe una tendencia a considerar que durante la simbiosis las enzimas de *Rhizobium* involucradas en la asimilación de amonio pueden permanecer reprimidas para ayudar a la exportación del amonio (Hilgert *et al.*, 1987; Osburne y Signer, 1980). Sin embargo, hay evidencias que indican lo contrario. La actividad de GOGAT ha sido encontrada en bacteroides aislados de nódulos en diferentes *Rhizobium* ssp. (Brown y Dilworth, 1975). Además la actividad de GSI está presente en bacteroides de *R. etli* aislados de nódulos de frijol (Moreno *et al.*, 1991) y también se reporta la síntesis de metabolitos nitrogenados en la bacteria durante la simbiosis (Miller *et al.*, 1991; Salminen y Streeter, 1987).

Los resultados publicados por Mendoza *et al.*, (1998), demuestran que la expresión constitutiva de GDH durante la simbiosis resulta en la asimilación de amonio por el bacteriote lo que ocasiona un cambio en la partición del nitrógeno fijado entre la bacteria y la planta, se puede sugerir la existencia de metabolismo nitrogenado dentro del bacteroide. Dado lo anterior, cabría preguntarse qué pasa con la vía GS/GOGAT propia de la bacteria durante la simbiosis.

Una manera de conocer más acerca de la asimilación de amonio en bacteroides es interrumpiendo un gene de esta vía, pero como ya mencionamos, se sabe que en *R. etli* se presentan más de una GS. por lo tanto, el gene de GOGAT es el adecuado para manipular. Aunque ya se ha caracterizado el fenotipo de cepas de *Rhizobium* deficientes en la actividad

de GOGAT (Kondorosi *et al.*, 1977; O'Gara *et al.*, 1984; Donald y Ludwig, 1984). se conoce poco acerca de los genes que codifican para esta enzima en rhizobiaceas, ya que sólo se han clonado los genes de *R. meliloti* (Lewis *et al.*, 1990) y *A. caulinodans* (Hilgert *et al.*, 1987), pero en estos trabajos sólo se reporta el aislamiento de una región *gltBD*, que complementa mutantes GOGAT, pero no se ha estudiado en detalle su organización genética o su regulación (Lewis *et al.*, 1990; Hilgert *et al.*, 1987). Tampoco se ha reportado la existencia de genes reguladores.

Dado lo anterior, en este trabajo se reporta la clonación y caracterización del locus *glt* que codifica para la Glutamato sintasa (GOGAT) en *R. etli*, así como la caracterización fisiológica y simbiótica de una cepa deficiente en GOGAT. De esta manera, se pretende responder algunas de las interrogantes acerca de como se lleva a cabo el metabolismo nitrogenado en rhizobeaceas tanto en vida libre como durante la simbiosis.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y plásmidos. Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran descritos en la tabla I.

Condiciones de crecimiento. Las cepas de *R. etli* fueron crecidas a 30°C con una agitación de 200 rpm en medio rico (PY) que contiene peptona al 0.5%, extracto de levadura al 0.3% y CaCl_2 7 mM o en medio mínimo (MM) (Encarnación *et al.*, 1995) conteniendo K_2HPO_4 1.26 mM, MgSO_4 0.83 mM, succinato 10 mM, NH_4Cl 10 mM estos dos últimos como fuentes de carbono y nitrógeno, suplementado con CaCl_2 1.5 mM y FeCl_3 0.0184 mM. Para su crecimiento en medio mínimo, las bacterias fueron previamente crecida en PY por 12 hrs y lavadas dos veces con agua estéril para inocular el MM a una $\text{D.O}_{540\text{ nm}} = 0.05$.

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas a 37°C en medio rico Luria-Bertani que contiene: peptona de caseína al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1% (Miller, 1972). Como medio mínimo se utilizó el reportado por Valderrama *et al.*, (1996) el cual contiene: MgSO_4 4mM, K_2HPO_4 11 mM, KH_2PO_4 51 mM, NH_4Cl 10 mM y glucosa al 0.2%. Cuando fue requerido se añadió: prolina, histidina, leucina, arginina y treonina a una concentración final de 1mM, y en el caso de tiamina se utilizaron trazas (0.5µg/ml).

Los antibióticos fueron añadidos en las siguientes concentraciones finales: kanamicina (Km) 30 µg/ml, estreptomycin (Sm) 100 µg/ml, espectinomycin (Sp) 20 µg/ml, carbenicilina (Cb) 100 µg/ml, tetraciclina (Tc) 10 µg/ml y ácido nalidixico (Nal) 20 µg/ml.

Determinación de la actividad específica de GOGAT. Los extractos bacterianos fueron preparados a partir de cultivos de 12 hrs en MM, los cuales fueron centrifugados y resuspendidos en 1.5 ml de buffer de extracción (KCl 0.1 M y 2-mercaptoetanol al 0.5 % a un pH de 7.6). Las muestras se sonicaron

con 5 pulsos de 30 seg cada uno a una amplitud de 7 microns, el sobrenadante se colectó después de centrifugar a 4°C durante 3 min a 13,000 rpm (12,054 x g).

Las actividades de GOGAT fueron determinadas midiendo la oxidación de NADPH a una absorbancia de 340 nm, en una mezcla conteniendo HEPES 50 mM (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico), 2-mercaptoetanol al 1% (pH 8.5), glutamina 3.65 mM, 2-cetoglutarato 3 mM, NADPH 0.2 mM y 0.1 ml del extracto bacteriano. La actividad específica es expresada en unidades por mg de proteína donde una unidad representa una nmola de NADPH oxidado por min (Bravo y Mora, 1988).

Manipulación del DNA. En general para todas las técnicas de biología molecular se siguieron los procedimientos descritos previamente (Sambrook *et al.*, 1989).

Extracción del DNA. El DNA plasmídico de *E. coli* fue extraído a partir de un cultivo de 12 hrs en medio rico mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA cromosomal de *Rhizobium* se extrajo de un cultivo en medio rico crecido a saturación por medio de la metodología reportada por Ausubel *et al.*, 1995: Preparación de DNA genómico de bacteria, protocolo corto.

Digestión con enzimas de restricción y ligado de fragmentos de DNA. Tanto el DNA plasmídico como el cromosomal se digirieron con diferentes enzimas de restricción según correspondiera y siguiendo las instrucciones del proveedor para cada enzima en particular.

Los fragmentos de DNA conteniendo las secuencias de interés se ligaron al vector correspondiente en una proporción inserto:vector de 3:1 utilizando T4 DNA ligasa e incubándose a 14°C durante 14 hrs.

Transformación de *E. coli*. Las células competentes de *E. coli* fueron obtenidas por el método de CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989) y almacenadas a

-70°C. Las células competentes se descongelaron en hielo y se les agregaron de 30 a 100 ng de DNA, incubándose por 20 min en hielo. Después se dió un choque térmico a 42°C por 2 min, se les agregó 1 ml de LB y se incubaron durante 1 hr a 37°C con agitación, lo cual permitió la recuperación de las bacterias y la expresión de la resistencia al antibiótico codificado por el plásmido. Se plaquearon alicuotas de 200 µl en cajas de medio de selección.

Conjugación por cruza triparental. La movilización de los plásmidos dentro de la cepas de *R. etli* se hicieron por medio de cruza triparentales, auxiliada por el plásmido pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980).

Hibridizaciones de DNA del tipo Southern. Los fragmentos de DNA digeridos con las enzimas apropiadas se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM pH8, EDTA 1mM), durante 2 hrs a 100 V para DNA plasmídico y durante 12 hrs a 40 V para DNA cromosomal. El patrón de digestión se visualizó al teñir el gel con bromuro de etidio y observado bajo luz UV. Posteriormente el DNA se desnaturalizó por 30 min (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 N), después se neutralizó durante 15 min (Tris 1 M pH 7.4, NaCl 1.5 M) y finalmente se lavó en 6X SSC (SSC 20X: NaCl 3M y Na₃citrato·2H₂O 0.3 M a pH 7.0). El DNA fue transferido a membranas de nylon (Amersham, UK) por transferencia capilar e inmovilizado con luz UV a 12000 µjoules (crosslinker: UV Stratalinker 1800, Stratagene).

La hibridación de las membranas se realizó utilizando la sonda apropiada marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP mediante el Kit Megaprime (Amersham, UK). Las condiciones para hibridización estricta fueron: prehibridización 2 hrs e hibridización 2 hrs a 65°C en buffer Rapid-hyb (Amersham, UK). Los lavados se llevaron a cabo primeramente a temperatura ambiente en SSC 2X/SDS 0.1% durante 5 min, después tres lavados con SSC 0.1X/SDS 0.1% de 30 min cada uno a 65°C y un último lavado durante 15 min a temperatura ambiente con SSC 0.1X. Para hibridizaciones relajadas las condiciones de temperatura de prehibridización e hibridización fueron a 42°C con un periodo de incubación de 2 y 12 hrs, respectivamente. Las membranas se expusieron en films Kodak (X-

Omat) y se revelaron a diferentes tiempos de acuerdo a las condiciones de hibridización.

Secuencia y análisis de DNA. El DNA de doble cadena fue secuenciado por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Las determinaciones de la secuencia de los genes *gltBD* de *R. etli*, se llevaron a cabo en Medigen GmbH, Munich, Alemania, usando el sistema de secuencia Applied Biosystems (Foster City, Calif.) 373A DNA. En el laboratorio las secuencias se obtuvieron utilizando los Kits: Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing pre-mix (Amersham, Life Science) y DNA Sequencing dye terminator cycle sequencing ready reaction (Perkin-Elmer).

El análisis computacional de las secuencias fue llevado a cabo con el paquete de programas Genetics Computer Group (GCG) (Devereux *et al.*, 1984), con el programa "GeneWorks" (Glynias, 1991) y con el programa de análisis de promotores disponible en el URL <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/gene-search.html>.

Condiciones de crecimiento de las plantas. Se esterilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* L cv. Negro Jamapa superficialmente con cloro al 20%, posteriormente enjuagadas con H₂O estéril y se germinaron bajo condiciones estériles por tres días en obscuridad a 30°C. Las plántulas fueron transferidas a macetas de plástico conteniendo vermiculita estéril como soporte e inoculadas con 1 ml de un cultivo de *R. etli* (10⁷ células/planta) crecido en PY por 12 hrs, previamente lavado en solución salina (NaCl al 0.85%). Las condiciones de crecimiento de las plantas en el invernadero fueron a temperaturas de 22 a 28°C y una humedad relativa del 50 al 60%.

Caracterización simbiótica. Grupos de 10 plantas para cada condición fueron cosechadas a los 18, 25, 32 y 39 días postinoculación (dpi). El peso seco de nódulo, la actividad de nitrogenasa, peso seco de la planta, la concentración de ureidos en el xilema, el contenido de nitrógeno en planta y la concentración de aminoácidos en bacteroides fueron determinados para cada tiempo.

Actividad específica de la nitrogenasa. La actividad de nitrogenasa (μmol de etileno producido/h/g de peso seco de nódulo), fue determinada por la reducción del acetileno a etileno, incubando las raíces separadas de la planta con 1/80 (v/v) de acetileno. La producción de etileno fue cuantificada en un cromatógrafo de gases Varian 3300.

Determinación de ureidos. Se decapitaron grupos de 5 plantas 1 cm arriba de la corona y se les colocó un tubo de plástico en el corte para coleccionar la solución del xilema. El contenido de ureidos fue determinado colorimétricamente de acuerdo al método descrito por Vogel y van der Drift (1970).

Cuantificación de nitrógeno total. El contenido de nitrógeno total de plantas y semillas fue determinado con un analizador de nitrógeno (modelo ANTEK 7000; Antek instruments, Inc. Houston, Tx.) y reportado en mg de nitrógeno/mg de peso seco de planta o semilla

Purificación de bacteriodes. Se maceraron nódulos frescos provenientes de 5 plantas en solución PBS (NaCl 150 mM y KH_2PO_4 50 mM, pH 7.6) y se filtraron a través de varias capas de gasa estéril para posteriormente ser transferidos a un tubo conteniendo una solución de percoll (3.5 ml de KH_2PO_4 0.5 M + NaCl 1.5 M, 24.5 ml de percoll, aforado a 35 ml). Los bacteriodes purificados por centrifugación a 17,500 rpm ($24,010 \times g$) durante una hora en este gradiente (Reibach *et al.*, 1981) fueron recuperados y lavados dos veces con PBS. Después de ser resuspendidos en 2 ml de agua estéril, fueron sonicados 2 veces durante 60 seg; se separaron los desechos celulares por centrifugación y finalmente el sobrenadante fue liofilizado, quedando listo para la determinación de aminoácidos.

Para conocer la concentración de aminoácidos intra y extracelulares en *R. etli*, los cultivos se centrifugaron de 12 y 24 horas en MM-glutamina a 10,000 rpm ($9.632 \times g$) durante 10 min a 4°C , se tomaron 20 ml del

sobrenadante y se liofilizaron. La pastilla se resuspendió en 10 ml de etanol al 80%, se calentó a 100°C durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La muestra una vez fría se sonicó 2 veces durante 60 seg. se separaron los desechos celulares por centrifugación y el sobrenadante se liofilizó para finalmente hacer la determinación.

Determinación de aminoácidos. Los aminoácidos fueron cuantificados fluorimetricamente usando la técnica de derivatización de precolumna con 9-flouorenimetil-cloroformato en una columna Nova-Pack C18 (Waters Milford, Mass.; 3.9 x 150 mm [diámetro interno]). La separación de aminoácidos se llevó a cabo con un gradiente de elución del 20 al 73 % del solvente A y B (Solvente A: 0.5 M acetato de sodio [pH 3.5-3.8] ajustado con ácido acético; Solvente B: acetonitrilo) a un flujo de 1 ml por min a 45°C. Los aminoácidos fueron detectados con un fluorómetro (Waters modelo 420 AC) a una longitud de onda de excitación y emisión de 254 y 313 nm, respectivamente y equipado con una lámpara de mercurio G475 (Waters). La concentración de aminoácidos es expresada en nmol/mg de proteína.

Microscopía óptica. Las raíces primarias, con nódulos completamente desarrollados (25 dpi), fueron colectadas y fijadas en glutaraldehído al 2.5 % en buffer fosfato de potasio 10 mM [pH 7.5] y EDTA 1mM. Los nódulos se cortaron en segmentos de 100 µm de longitud con un vibratomo (Serie 1000, Technical Products International Inc., St. Louis, Mo.), teñidos inmediatamente con el colorante de tejidos vegetales Epoxy (Electron Microscopy Sciences FT., Washinton, Pa.) y finalmente observados en un microscopio óptico Zeiss.

Microscopía electrónica de transmisión. Los nódulos completamente formados fueron fijados en glutaraldehído (2.5 % en buffer fosfato de potasio 10 mM [pH 7.5] y EDTA 1mM) por una hora y posteriormente postfijados en tetraóxido de osmio (1% en buffer fosfato de sodio 0.15 mM [pH 7.0]) por una hora. Las muestras fijadas fueron rápidamente lavadas con agua destilada, deshidratadas a través de diferentes concentraciones de etanol (25, 50, 75, 90

y 100%) y finalmente embebidas en polímeros de plástico (Resinas Epon). Los cortes ultrafinos se obtuvieron con un Reichert Ultracut S Ultramicrotome (type 702501; Leika, A.G. Reichert Division, Vienna, Austria), colocados en gradillas con formvar y teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963). Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-900 para observar los cortes ultrafinos.

Tabla 1. Cepas y plásmidos

CEPAS	Características Relevantes	Referencia
<i>E. coli</i>		
PA340	<i>gltB31, gdh-1</i>	B. Bachmann, 1972
MX1176	$\Delta(\text{pro-lac}) \text{galE ilv-680 thi-1 gdh-1 gltB225::}\Omega$; Sm ^R , Sp ^R	Castaño <i>et al.</i> , 1988
HB101	F- <i>hsdS20-recA13</i>	Boyer <i>et al.</i> , 1969
DH5 α	$\Delta\text{lacU169 } (\text{Ø80lac}\Delta\text{M15}) \text{recA1 endA1 gyrA96}$ <i>thi-1 relA1</i> ; Nal ^R	Bethesda Research Laboratories 1986
<i>R. etli</i>		
CE3	Sm ^R , derivada de la cepa silvestre CFN42	Noel <i>et al.</i> , 1984
TAD12	<i>gltB::Tn5</i> ; Nal ^R , Km ^R	Este trabajo
TAD11	inserción del Tn5; Nal ^R , Km ^R	Este trabajo
PLASMIDOS		
pRK2013	Col E1 <i>mob*Tra</i> (RK2); Km ^R	Figurski <i>et al.</i> , 1979
pLAFR1	Cósmido de amplio rango, Mob ⁺ , Tra ⁺ ; IncP;Tc ^R	Friedman <i>et al.</i> , 1982
pBluescriptSK	Vector de clonación, Cb ^R .(pSK)	Stratagene
pHB10	pLAFR1, locus <i>glt</i> ORS571; Km ^R , Tc ^R	Hilgert <i>et al.</i> , 1987
c12-1A	pLAFR1, locus <i>gltBD</i> de <i>R. etli</i> ; Tc ^R	Este trabajo
pAC22	pSK, 12.2 Kb locus <i>gltBD</i> de <i>R. etli</i> derivado del c12-1A, Cb ^R	Este trabajo
p1A-D	pSK, 1.8 Kb EcoRI de c12-1A; Cb ^R	Este trabajo
p1A-11	pSK, 1.6 Kb EcoRI de c12-1A; Cb ^R	Este trabajo
p1A-10	pSK, 0.8 Kb EcoRI de c12-1A; Cb ^R	Este trabajo
p1A-8	pSK, 1.55 Kb EcoRI de c12-1A; Cb ^R	Este trabajo
p1A-E	pSK, 1.0 Kb EcoRI de c12-1A; Cb ^R	Este trabajo
pT11	pSK, 2.0 Kb + Tn5, EcoRI de la TAD11, Cb ^R , Km ^R	Este trabajo
pT12	p1A-E::Tn5; Cb ^R , Km ^R	Este trabajo

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se dividen en tres partes: 1) la caracterización genética del operón (*gltBD*) que codifica para GOGAT en *R. etli*, 2) la caracterización fisiológica de una cepa mutante GOGAT⁻ de *R. etli* y 3) el fenotipo simbiótico de la misma mutante GOGAT⁻ de *R. etli*.

1) Caracterización genética del operón *gltBD* de *R. etli*.

1.1) Complementación de las cepas Asm⁻ de *E. coli*.

La primera estrategia que se siguió para clonar el operón que codifica para la enzima glutamato sintasa fue movilizar el banco genómico de *R. etli* clonado en cósmidos derivados de pLAFR1, dentro de las mutantes PA340 y MX1176 de *E. coli* (Tabla I).

Si bien se llevaron a cabo las complementaciones de estas dos cepas mutantes con el banco genómico, los cósmidos obtenidos que complementaron resultaron ser falsos positivos ya que en éstos no se encontraron los genes estructurales de la GOGAT. Los diversos estudios realizados con estas cepas fueron: el crecimiento en MM-NH₄⁺ y los valores obtenidos de las actividades específicas de GOGAT, sin embargo la secuencia de una subclona que seguía complementando a las mutantes no mostró similitud con los genes de la GOGAT reportados para otras bacterias como *E. coli* o *Azospirillum brasilense*. La explicación de que en la subclona no se encontraran los genes de GOGAT a pesar de que estos estudios mostraban lo contrario, aún no la hemos podido interpretar ya que, por un lado, las mutaciones en la cepa PA340 no han sido bien caracterizadas: sólo se había descrito en esta cepa una mutación que daba como resultado la pérdida de la actividad de GOGAT designada *gltB31* (Pahel *et al.*, 1982), pero posteriormente se estableció que esta cepa contiene al menos dos mutaciones, una delección del operón *gltBD* y otra mutación aparentemente en un regulador positivo de la síntesis de la GOGAT (Castaño, tesis de

doctorado). Por otro lado, cuando utilizamos a la mutante MX1176 como cepa receptora del banco genómico de *R. etli* para su complementación, ésta mostró un alto índice de reversión para la mutación *gdh*, por lo que se dificultó la complementación .

Paralelamente a este trabajo, H. Taboada en el laboratorio seleccionó dos cepas mutantes de *R. etli* inducidas con el transposón Tn5 que no crecían en amonio pero sí en glutamato (Glu). Estas cepas se han caracterizado y se les ha denominado TAD11 y TAD12.

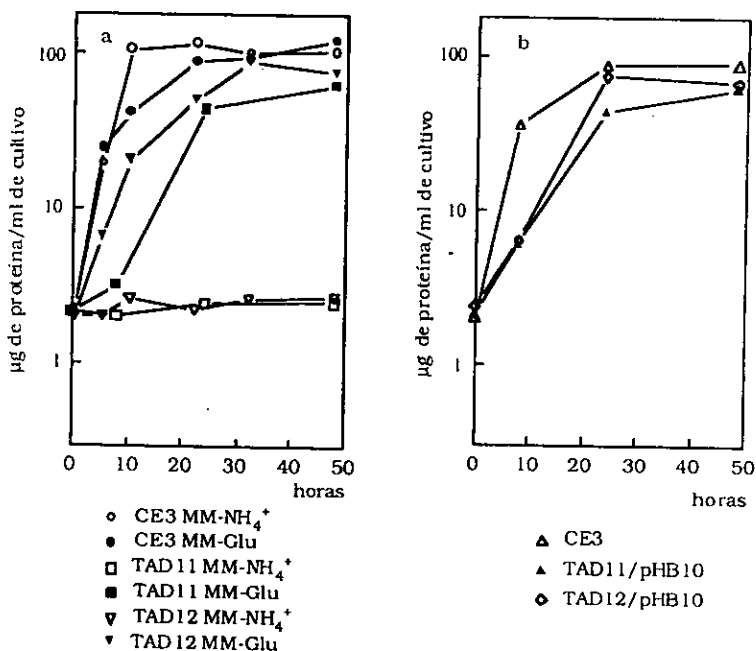
1.2) Caracterización de las mutantes.

El primer paso para caracterizar la cepas TAD11 y TAD12 fue obtener sus cinéticas de crecimiento en MM-NH₄⁺ y MM-Glu y compararlas con la cepa padre CE3 de *R. etli*. Los resultados de estos ensayos son presentados en la Fig. 6a, en la cual se muestra que ambas mutantes son auxótrofas de glutamato.

1.3) Complementación con el operón *gltBD* de *A. caulinodans*.

En base a los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento (Fig. 6a) el siguiente paso fue transferir el plásmido pHB10 a estas mutantes (TAD11 y TAD12), el cual contiene un fragmento de DNA de 12.3 kb que complementa la auxotrofia por glutamato de la cepa GOGAT⁻ GDH⁻ de *E. coli* (PA340) y las mutantes GOGAT⁻ de *A. caulinodans* (KAK6-5 y GAV1-20) y contiene el locus *glt* de *A. caulinodans* (Hilgert *et al.*, 1987). Su comportamiento en MM-NH₄⁺ es presentado en la Fig. 6b, en la cual se muestra que ambas mutantes recuperan la prototrofia cuando portan este plásmido.

Figura 6. a) Cinética de crecimientos en MM-NH₄⁺ (10 mM) y MM-Glu(10 mM) de la cepa CE3 y de las cepas mutantes TAD11 y TAD12. b) Crecimientos en MM-NH₄⁺ de las cepas CE3 y mutantes TAD11 y TAD12 complementadas con el plásmido pHB10 el cual lleva el fragmento de 12.3 kb de la GOGAT de *A. caulinodans*.



1.4) Hibridación genómica de las mutantes TAD11 y TAD12.

Con el fin de localizar las inserciones del Tn5 en las mutantes TAD11 y TAD12 se extrajo el DNA genómico de estas cepas, así como el de la cepa silvestre CE3. El DNA cromosomal se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*, ya que el Tn5 no tiene sitio de corte para esta enzima. Un fragmento interno del locus *gltBD* (3.2 kb *Sall-SmaI*) de *A. caulinodans* derivado del plásmido pHB10 fue utilizado como sonda radiactiva. La hibridación se llevó a cabo en condiciones relajadas (42°C). La autoradiografía de esta hibridación mostró que en la cepa silvestre quedaron representadas dos bandas una de

1.6 Kb y otra de aproximadamente 1 Kb, encontrándose este mismo patrón de hibridación para la mutante TAD11, mientras que en la mutante TAD12 se presentó la banda de 1 Kb y otra banda de 7.4 Kb. Esta última correspondiendo a la suma del fragmento de 1.6 Kb más 5.8 Kb del Tn5 (Fig. 7). Una segunda hibridación se realizó utilizando como sonda radiactiva el Tn5, dando como resultado que en la mutante TAD12 el mismo fragmento de 7.4 kb dio señal (Fig. 8); en cambio para la mutante TAD11 se encontró una banda de hibridación ligeramente más pesada que la encontrada en la TAD12 de aproximadamente 8 kb, aunque en la Fig. 8 se ven dos bandas de hibridación en el carril del DNA de la TAD11, la de mayor peso molecular presenta menos señal que la de menor peso, lo cual nos indica que la digestión del DNA genómico fue parcial y que la banda importante es la de mayor señal.

Figura 7. Hibridación del DNA genómico de la cepa silvestre CE3 (carril 2), de las mutantes TAD11 (carril 3) y TAD12 (carril 4) digeridas con *EcoRI*, utilizando como sonda un fragmento interno del operón *glt* de *A. caulinodans* de 3.2 kb *SalI-SmaI*. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular de 1.6 kb.

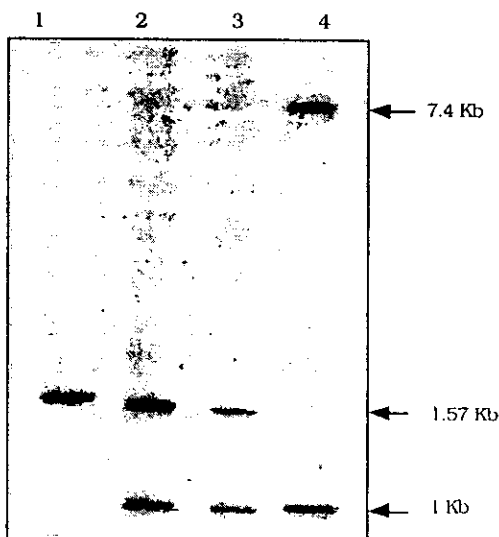
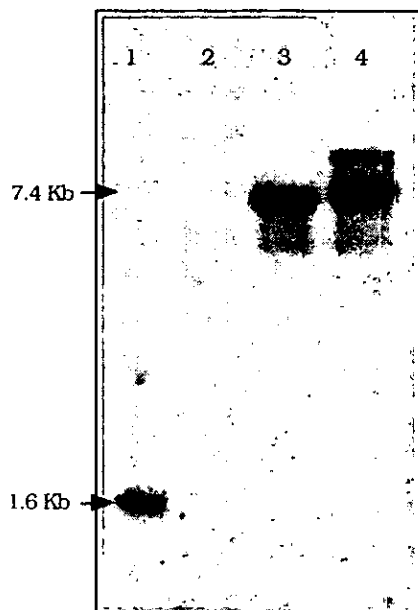


Figura 8. Hibridación del DNA genómico de la cepa silvestre CE3 (carril 2), de las mutantes TAD12 (carril 3) y TAD11 (carril 4) digeridas con *EcoRI*, utilizando como sonda el Tn5. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular de 1.6 Kb.



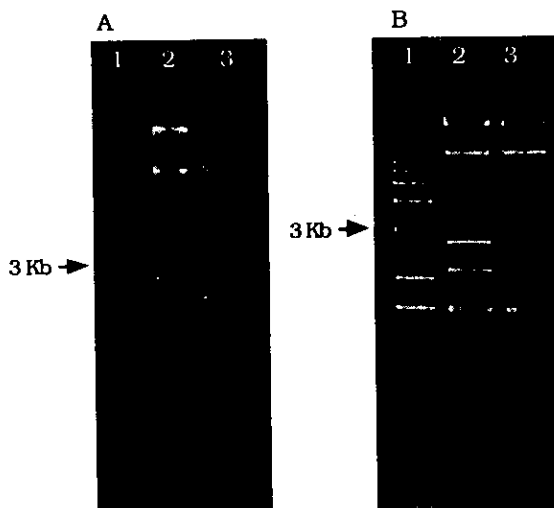
1.5) Subclonación y secuencia de las inserciones del Tn5.

Para conocer la secuencia nucleotídica del gene interrumpido por el transposón Tn5 en las mutantes TAD11 y TAD12, estos fueron clonados como un fragmento *EcoRI* de 8.2 Kb para la TAD11 y un fragmento *EcoRI* 7.35 Kb para la TAD12 en el vector pBluescriptSK (Tabla I) generando los plásmidos pT11 y pT12, respectivamente. En la secuencia preliminar obtenida a partir de la subclona pT11, proveniente de la TAD11, no se

encontró homología con genes de GOGAT. En cambio, los resultados de las primeras 550 pb secuenciadas del plásmido pT12 mostraron que para la mutante TAD12 el Tn5 se encuentra insertado en una región homóloga al gene *gltB* de *E. coli* y *A. brasilense*. El alineamiento de los residuos de aminoácidos deducidos a partir de los primeros 550 nucleótidos secuenciados de la subclona pT12 muestran similitud con el extremo 3' de *gltB* (Fig. 12) de *E. coli* y de *A. brasilense*, presentando una identidad del 45.7% y una similitud del 65.7% con *E. coli*, y una identidad del 54.3% y una similitud del 68.6% con *A. brasilense*. En base a este alineamiento podemos observar que la parte de la subclona pT12 codifica para los residuos de aminoácidos 1131 y 1231 de *gltB* y el Tn5 se localiza después de este último.

Simultáneamente a la clonación de las inserciones Tn5, se transfirió el banco genómico de *R. etli* (representado en 1200 cósmidos) en ambas mutantes. De esta manera se identificaron 6 diferentes cósmidos que complementan a las mutantes. En la Fig. 9A podemos observar el patrón de restricción de dos de los tres cósmidos que complementan a la mutante TAD11 y que comparten por lo menos 3 bandas. En la Fig. 9B se presenta el patrón de restricción de dos de los tres cósmidos que complementan a la mutante TAD12, que comparten al menos 7 bandas. Los resultados de las hibridaciones junto con las secuencias nucleotídicas obtenidas nos indican que las inserciones del Tn5 en ambas mutantes se encuentran en secuencias diferentes.

Figura 9. Geles de agarosa con los cósmidos que complementan a las mutantes TAD11 (A) y TAD12 (B). Gel A) Carriles: 1, marcador de 1 Kb; 2, cósmido c11-3A; cósmido c11-5A. Gel B) Carriles: 1, marcador de 1 Kb; 2, cósmido c12-3A; 3, cósmido c12-1A.



De acuerdo con estos resultados, en la cepa TAD12 el gen *gltB*, estructural de la GOGAT, se encuentra interrumpido por la inserción del Tn5. Por lo anterior, esta cepa fue utilizada en la clonación del operón *gltBD* de *R. etli* y para la caracterización fisiológica y simbiótica de una cepa deficiente en GOGAT.

1.6) Complementación de la mutante TAD12 con el banco genómico de la CE3.

Se determinó la cinética de crecimiento en MM-NH₄⁺ de la mutante TAD12 complementada con los dos cósmidos c12-3A y c12-1A (Fig. 10). Podemos observar que el tiempo de duplicación y la biomasa alcanzada por la

mutante TAD12 complementada con el cósmido c12-1A es mejor. En la tabla 2 se presentan sus respectivas actividades específicas de GOGAT, la cual muestra que la actividad medida para el cósmido c12-1A es mayor que la de la cepa silvestre y superior a la del c12-3A. Estas mismas actividades fueron medidas en presencia de L-metionina sulfona (MSF), inhibidor específico de la actividad de GOGAT (Master y Meister, 1982), presentando una reducción del 94%, por lo cual corroboramos que las actividades determinadas en todas las cepas son las actividades de GOGAT.

Figura 10. Cinética de crecimiento en $MM-NH_4^+$ de la CE3, TAD12 y TAD12 complementada con dos diferentes cósmidos

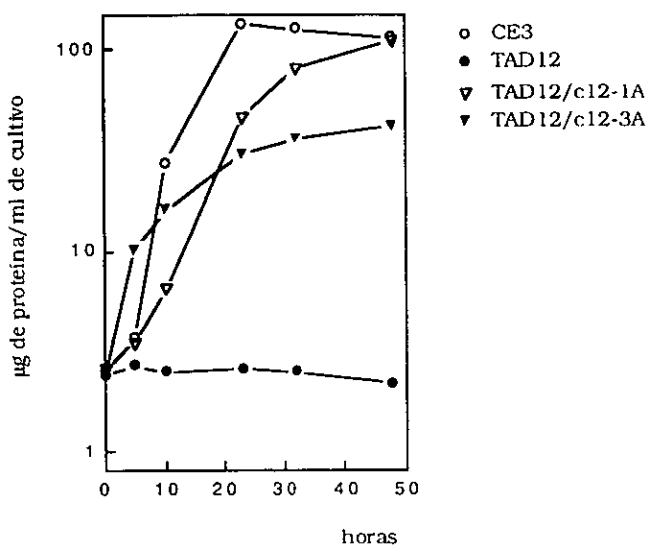


Tabla 2. Actividades de GOGAT en la mutante TAD12 complementada con los cósmidos c12-1A y c12-3A

CEPA	Actividad específica de GOGAT ^a	
		+MSF ^b
CE3	65.00	4.54
TAD12	0.66	ND ^c
TAD12/c12-1A	175.40	8.65
TAD12/c12-3A	96.91	5.33

a. U/mg de proteína

b. Metionina sulfona 10 mM

c. Actividad no determinada

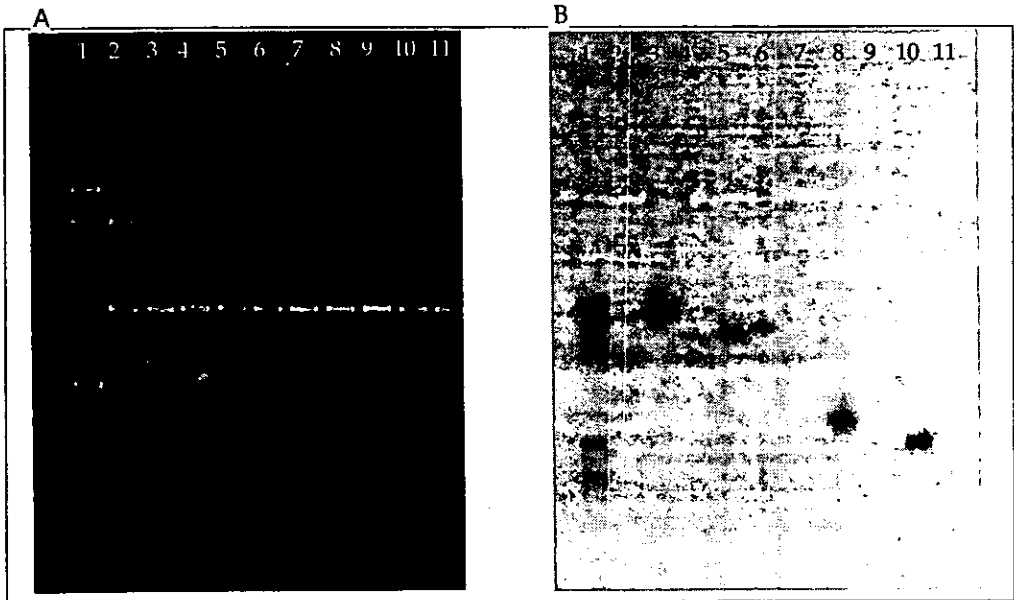
1.7) Identificación de los genes estructurales de la GOGAT dentro del cósmido c12-1A.

El cósmido c12-1A fue seleccionado para la subclonación y secuenciación de los genes estructurales de la GOGAT (operón *gltBD*) en *R. etli*, ya que este cósmido presentó la mayor actividad de GOGAT (Tabla 2). una mejor complementación de la mutante para los crecimientos en MM+NH₄⁺ (Fig. 10) y contuvo el menor fragmento de DNA que el resto de los cósmidos (aproximadamente 20 Kb, Fig. 9B).

Los fragmentos generados por la enzima de restricción *EcoRI* del cósmido c12-1A fueron subclonados en el vector pSK (Tabla 1). Estas diferentes subclonas fueron hibridizadas contra una sonda heteróloga derivada del plásmido pHB10 en donde se encuentra el locus *gltBD* de *A. caulinodans* [fragmento de 5.3 Kb *SalI* que hibridiza contra los genes *gltBD* de *E. coli* (Hilgert *et al.*, 1987)]. En la Fig. 11 se muestra el gel del cósmido

c12-1A digerido con *EcoRI* con sus respectivas bandas subclonadas en el pSK y la autoradiografía de la hibridación, en la cual se puede observar que al menos en cinco de las bandas se presenta señal con los genes que constituyen el locus de GOGAT.

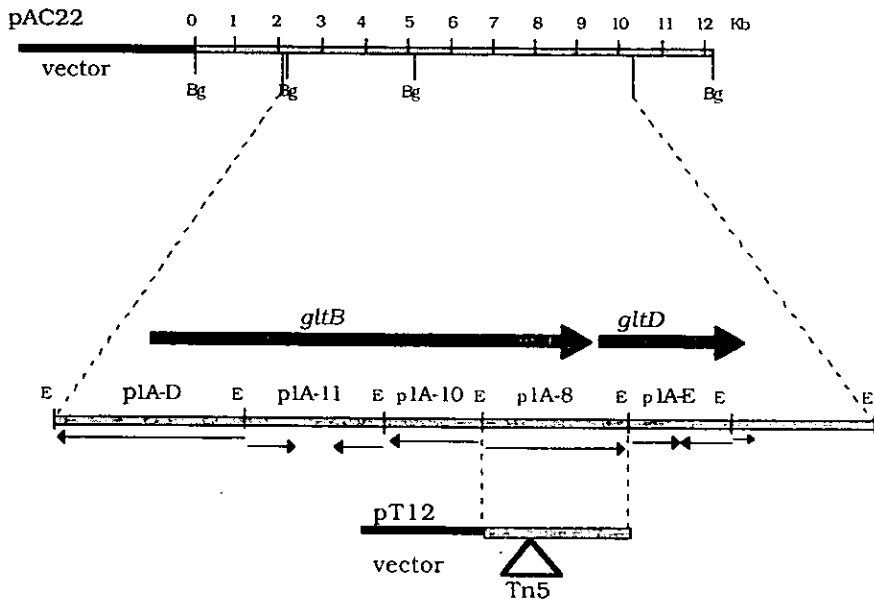
Figura 11. Hibridación de c12-1A y sus subclonas correspondientes, utilizando como sonda un fragmento de 5.3 Kb de GOGAT de *A. caulinodans*. A) Gel del cósmido c12-1A (carril 1) digerido con *EcoRI* y sus respectivas subclonas: p1A-G de 8.4 Kb (carril 2); p1A-D de 1.8 Kb (carril 3); p1A-20 de 1.6 Kb (carril 4); p1A-8 de 1.6 Kb (carril 5); p1A-11 de 1.6 Kb (carril 6); p1A-2 de 1.5 Kb (carril 7); p1A-E de 1.0 Kb (carril 8); p1A-H de 0.9 Kb (carril 9); p1A-10 de 0.8 Kb (carril 10); p1A-3 de 0.4 Kb (carril 11). B) Autoradiografía tipo Southern del gel mostrado en A después de la hibridización con el fragmento interno del plásmido pHB10 que contiene GOGAT de *A. caulinodans*.



1.8) Clonación del locus que codifica para la GOGAT en *R. etli*.

Un fragmento de DNA de 12.2 Kb *Bgl*III del cósmido c12-1A que contienen los genes estructurales de la GOGAT (*gltBD*) de *R. etli* fue clonado en el vector pSK, resultando el plásmido pAC22 (Fig. 12). Dentro de este fragmento podemos observar que la organización de los genes *gltBD* es similar a la de *E. coli*: primero encontramos a la subunidad grande y después a la subunidad chica.

Figura 12. Representación esquemática del plásmido pAC22 que contiene los genes *gltBD* de *R. etli*. Ubicación del Tn5 dentro de *gltB* en el plásmido pT12. Enzimas de restricción: Bg, *Bgl*III y E, *Eco*RI. Las flechas abajo de las subclonas indican las regiones secuenciadas.



1.8.1) Secuencia nucleotídica de los genes estructurales de la GOGAT de *R. etli*.

Las subclonas que comparten homología con el locus *glt* de *A. caulinodans* (Fig. 11) se utilizaron para determinar la secuencia nucleotídica de aproximadamente 7000 pares de bases, las cuales se analizaron por medio de los programas blast y/o fasta dentro del paquete computacional GCG (Devereux *et al.*, 1984). En estas secuencias se pudieron identificar 2 ORF's con homología a la subunidad grande (*gltB*) y a la subunidad chica (*gltD*) de GOGAT. En la Fig. 13 se muestra la secuencia obtenida de ambas subunidades en donde se señalan diferentes motivos: en el nucleótido 824 el residuo de metionina (ATG) con la cual podría iniciarse la síntesis de la subunidad grande, GltB, hasta el nucleótido 4944, identificados a partir de la traducción y el análisis en el programa GenWorks; en el nucleótido 812 un sitio potencial de pegado a ribosoma (RBS); así como dos regiones arriba del ATG del gene *gltB* ricas en A y T, identificadas como posibles regiones promotoras dependientes de sigma 70 a partir de secuencias consenso en procariotes. Una de ellas localizada de la posición -286 a la -331 y la segunda de la posición -330 a la -375 a partir del primer ATG. En el nucleótido 5172 el ATG con la cual podría iniciarse la síntesis de la subunidad chica, GltD, hasta el nucleótido 6522.

Figura 13. Secuencia nucleotídica de 7000 pb que corresponden al 5' del gene *gltB* y *gltD*, su secuencia deducida de aminoácidos. Las cajas grises indican las posibles regiones promotoras, el recuadro blanco el sitio de pegado a ribosoma (RBS), el recuadro negro los sitios de inicio de la fase abierta de lectura y los recuadros blancos las terminaciones. La interrupción de la secuencia que se presenta en *gltB* es una zona de la cual falta definir la secuencia.

```
AATTCGGCGCGCCGCATTCATCTTCGATCACATGGGCTTCCGAATGGCAGAAGTGATCCCGCGGGGCG 70
CTGGACGCTCGCCAGCCAGGGATTGGCGGCCGTGCCGGTGGCGACGAAGAAAACGGAAACCTCCCGTT 140
CGAAGATCTCGCAGAAGCGGGCCTCGACCTTTTATCGAGATCGCCGGCTCCATAGGCCGGGGCAAACC 210
```


CGACCAACACCTTCCCCTCATGGAAGCTCGCGCACCCCTATCGGATGGTCGCCATAACGGCGAGATCAA 1680
erThrAsnThrPheProSerTrpLysLeuAlaHisProTyrArgMetValAlaHisAsnGlyGluIleAs
CACGCTGCGCGGCAACGTCAACTGGATGGCGGCGCGACAGGCCTCGGTCTCTTCGCCGCTTTTCGGCGAG 1750
nThrLeuArgGlyAsnValAsnTrpMetAlaAlaArgGlnAlaSerValSerSerProLeuPheGlyGlu
GACATCTCCAAGCTCTGGCCGATTTCCTACGAGGGGCAGTCGGACACGGCCTGTTTCGACAATGCGCTGA 1820
AspIleSerLysLeuTrpProIleSerTyrGluGlyGlnSerAspThrAlaCysPheAspAsnAlaLeuA
ATTCTGGTGGCGGCGGCTATCGCTGGCGGTGCGGTGATGATGCTGATCCCGGAGGCCCTGGCCGGCA 1890
snSerTrpCysAlaAlaAlaIleAlaGlyAlaCysArgAspAlaAspProGlyGlyLeuGlyArgGl
ACCAGTCGATGGCGGCCGAACGCAAGGCCCTTCTACGAATATCATGCGGCGCTGATGGAGCCGTGGGACGG 1960
nProValAspGlyGlyArgThrGlnGlyLeuLeuArgIleSerCysGlyAlaAspGlyAlaValGlyArg
GCCGCTGCGGTGCGCTTCACCGACGGCAGGCAGATC3GCGCGACGCTCGACCGCAACGGCTCAGGCGCG 2030
AlaGlyCysArgCysLeuHisArgArgGlnAlaAspArgArgAspAlaArgProGlnArgLeuArgProA
CGCGCTACCTCGTCACCGACGACGATC3CGTCATCATGGCGTCTGAGGCCGGCGTCTGCCGGTTCCTGA 2100
laArgTyrLeuValThrAspAspArgValIleMetAlaSerGluAlaGlyValLeuProValProGl
AGAAAAGATCATCCAGAAGTGGCGCCTGCACGCCAGCAAGATGCTGCTGATCGACATGGAGGAAGGCCGT 2170
uGluLysIleIleGlnLysTrpArgLeuGlnProGlyLysMetLeuLeuIleAspMetGluGluGlyArg
ATCATCTCCGATGACGAGTGAATCGCAGCTTGCGACGGCGCATCCCTATCGCAGCTGGCT 2230
IleIleSerAspAspGluEndIleAlaAlaCysAspGlyAlaSerLeuSerGlnLeuAla
TGACTGACGATTCCATCGGGGTGCGGTACGCCCGTCATCATATTAATCGGAAGGGTTTGCACCTTGTGG 2300
EndLeuThrIleProSerGlyCysGlyThrProArgHisHisIleAsnArgLysGlyLeuHisLeuLeuA
CTTTTGTGTGAGACCGTGAGCGGGCGAAGGATCATTTTGTGTGCGCCGGTACGGCGCGGAGGGATCAACC 2370
laPheCysEndAspArgGluArgAlaLysAspHisPheAlaValAlaGlyThrAlaArgArgAspGlnPr
CTTTTTGCNNTTGACACGTTGTTGACATGCATGCCAAGGGGATTCCTCGAAGGAAGTGGACGCTTCGGAAT 2440
oPhePheAlaLeuThrArgCysEndHisAlaCysGlnGlyAspSerArgArgLysTrpThrLeuArgAsn
CGTCTACCGTTACATAAAGGCGGTFCGGCAAAGGCATTTCAAGGTCATGTCGAAGATGGCATTTCGACCT 2510
ArgLeuProLeuHisLysGlyGlyArgGlnArgHisPheLysValMetSerLysMetGlyIleSerThrT
ATCAGTCTATTGCGGCGCGCAGATCTTCGATGCGATCGGCCTGTCGTGCGAAGTGGTCGACAAGTATTT 2580
yrGlnSerTyrCysGlyAlaGlnIlePheAspAlaIleGlyLeuSerSerGluLeuValAspLysTyrPh
CTTCGGAACCGCGACGATGATCGAAGGTATCGGCCTCGAAGCAATCGCCGAAGAGACCGTCGCCCGCCAC 2650
ePheGlyThrAlaThrMetIleGluGlyIleGlyLeuGluAlaIleAlaGluGluThrValAlaArgHis
AACGCCGCTTCGGCAAGGATCCGCTGCTTGCACGACGCTCGATATCGGTGGCGAATACGCCCTACCGGA 2720
AsnAlaAlaPheGlyLysAspProLeuLeuAlaThrThrLeuAspIleGlyGlyGluTyrAlaTyrArgM
TGCGCGCGCAAGCCATGCCTGGACCGCGGATGCGGTTGCCGCTCTTCAGCACCGGTGCGCCGCAATGC 2790
etArgGlyGluSerHisAlaTrpThrProAspAlaValAlaAlaLeuGlnHisAlaValArgArgAsnAl
CGAGGATCGTTACCGGCAATTCGCCGAGATGCTGAACAATTCGGCGCTACGCATGAACACGATCCGTCGG 2860
aGluAspArgTyrArgGluPheAlaGluMetValAsnAsnSerAlaLeuArgMetAsnThrIleArgGly

CTCTTCAAGATCAAGAGCGCCGAGGGCTCGGCCGCAAGCCGGTATCGATCGACGAGGTCGAGCCGGCCG 2930
 LeuPheLysIleLysSerAlaGluAlaLeuGlyArgLysProValSerIleAspGluValGluProAlaA
 CCGATATCGTCAGGCGGTTCTCGACGGGGCAATGTCCTTCGGCTCGATCTCCCGGAGGCGCATACGAC 3000
 laAspIleValArgArgPheSerThrGlyAlaMetSerPheGlySerIleSerArgGluAlaHisThrTh
 GCTGGCGATCGCCATGAATCGGATCGGGCGCAAGTCGAACACCGCGAAGGCGGCGAGGAATCCGACCGC 3070
 rLeuAlaIleAlaMetAsnArgIleGlyGlyLysSerAsnThrGlyGluGlyGlyGluGluSerAspArg
 TATATGCCGCTTTCGGATGGTTCGATGAACCCGGAACGTTCCGGCGATCAAGCAGATCGCCTCGGGCCGCT 3140
 TyrMetProLeuSerAspGlySerMetAsnProGluArgSerAlaIleLysGlnIleAlaSerGlyArgP
 TCGGGCTCAGACCGAATATCTGGTCAACGCCGATGTGCTGCAGATCAAGGTGGCGCAGGGCCCAAGCC 3210
 heGlyValThrThrGluTyrLeuValAsnAlaAspValLeuGlnIleLysValAlaGlnGlyAlaLysPr
 CGGCGAAGGCGGCGAGCTGCCTCGGTCAAGGTCGATGCCGACAGTCGCCAAGACCCGTCACTCGACGCCG 3280
 oGlyGluGlyGlyGlnLeuProGlyHisLysValAspAlaThrValAlaLysThrArgHisSerThrPro
 GGTGTCGGCTGATCTCGCCCGCCGACACGACATCTACTCGATCGAGGATCTGGCGCAGTTGATCT 3350
 GlyValGlyLeuIleSerProProProHisHisAspIleTyrSerIleGluAspLeuAlaGlnLeuIleT
 ACGATCTGAAGAACGTC AACCCGACCTCCGACGTCTCGGTCAAGCTCGTCTCCGAAGTCGGCGTCGGCAC 3420
 yrAspLeuLysAsnValAsnProThrSerAspValSerValLysLeuValSerGluValGlyValGlyTh
 GGTGCCGCGGGCGTTGCCAAGGCGCGCCGATCATATCACCGTCGCAGGCTTCGACGGCGGCACGGGT 3490
 rValAlaAlaGlyValAlaLysAlaArgAlaAspHisIleThrValAlaGlyPheAspGlyGlyThrGly
 GCGTCGCCGCTGACTTCGTTCAAGCATGCCGGCAGCCCCGGAATCGGTCTTGCCGAACCCAGCAGA 3560
 AlaSerProLeuThrSerPheLysHisAlaGlySerProTrpGluIleGlyLeuAlaGluThrGlnGlnT
 CGTGGTGTGTAACGGCTGCGTTCGCGCGTTCGCTGCAGGTGGACGGCGGCTGAAGACCGCCGCGA 3630
 hrLeuValLeuAsnGlyLeuArgSerArgValAlaLeuGlnValAspGlyGlyLeuLysThrGlyArgAs
 CGTTATCATCGGAGCGCTCCTCGGCGCCGACGAATTCGGCTTCGCCACCGCGCCGCTGATCGCAGCCGGC 3700
 pValIleIleGlyAlaLeuLeuGlyAlaAspGluPheGlyPheAlaThrAlaProLeuIleAlaAlaGly
 TGCATCATGATGCGCAAGTGCCATCTGAACACCTGTCCGGTTCGGTGGCGACACAGGATCCGGTGTCTGC 3770
 CysIleMetMetArgLysCysHisLeuAsnThrCysProValGlyValAlaThrGlnAspProValLeuA
 GCAAGCGCTTCAAGGGCAGCCGGAGCAGTCATCAACTACTTCTTCTCGTTGCCAACGAAGTGCGCGA 3840
 rgLysArgPheLysGlyThrProGluHisValIleAsnTyrPhePhePheValAlaAsnGluValArgGl
 AATCCTCGCCTCGCTCGGCTTTACCCGGCTTGACGAGACTCATCGGCGCCTCATCGGGCTTCGGAACTC 3910
 uIleLeuAlaSerLeuGlyPheThrArgLeuAspGluThrHisArgArgLeuIleGlyAlaSerGluLeu
 CTGGAGAAGGACGAGATGCTGGCGCATTTGGAAGGCCAAGGGCCTCGACTTCAGCCGCATCTTCCACAAGG 3980
 LeuGluLysAspGluMetLeuAlaHisTrpLysAlaLysGlyLeuAspPheSerArgIlePheHisLysV
 TCGATGCCCCAAGGAGAAACCTTCTGGACGAGCCGGCAGCAGCACCCGATCGATGACATTCTCGACCG 4050
 alAspAlaAlaLysGluGluThrPheTrpThrSerArgGlnGlnHisProIleAspAspIleLeuAspAr
 CGTGCTGATCGAGCAGGCGCAGCCGGCGCTGACGGACAAGACGCCCGCTCGCCTTCGAGGTTGACATCAAG 4120
 gValLeuIleGluGlnAlaGlnProAlaLeuThrAspLysThrProValAlaPheGluValAspIleLys

AACGTCGACCGCTCGGCCGGCGCGATGCTGTCCGGCGAGGTCGCCAAGCGTTACCGGCATCGCGGGCTGA 4190
AsnValAspArgSerAlaGlyAlaMetLeuSerGlyGluValAlaLysArgTyrArgHisArgGlyLeuL
AGGAAGATACGATCAACGTGACGCTTCGGCCACGGCAGGCCAGAGCTTCGGTGCCTTCTGGCGCGCGG 4260
ysGluAspThrIleAsnValThrLeuArgGlyThrAlaGlyGlnSerPheGlyAlaPheLeuAlaArgGl
GGTCACCTTCAACCTGATCGGCGACGGCAACGACTATGTCCGCAAGGGACTCTCGGGCGGCAAGATCATC 4330
yValThrPheAsnLeuIleGlyAspGlyAsnAspTyrValGlyLysGlyLeuSerGlyGlyLysIleIle
ATCCGGCCCGCGAAAACCTCGCAGATCGTCGCCGAAGACTCGATCATCGTCGGCAATACCGTGCTTACG 4400
IleArgProProGluAsnSerGlnIleValAlaGluAspSerIleIleValGlyAsnThrValLeuTyrG
GAGCGACCGAGGGCGAGTGCTATTTCGGCGCGTGGCGGGCGAACGTTTCGGCGTCCGCAACTCGGGTGC 4470
lyAlaThrGluGlyGluCysTyrPheArgGlyValAlaGlyGluArgPheAlaValArgAsnSerGlyAl
GATCGCCATCGTCGAGGGCGTGGCGACCATGGCTGCGAATATATGACCGGGCGGTGTCGTCGTCGTACTC 4540
aIleAlaIleValGluGlyValGlyAspHisGlyCysGluTyrMetThrGlyGlyValValValValLeu
GGCGCCACCGCGCTAACTTCGGCGGGGCATGTCCGGCGCGTTCCTATGTGCTCGATGAAGCCGGCG 4610
GlyAlaThrGlyArgAsnPheAlaAlaGlyMetSerGlyGlyValAlaTyrValLeuAspGluAlaGlyA
ATTTTCCAGCCGCTGTAACATGGCGATGGTTCGAAGTGGAGCCGGTCCGGAAGAAGACGACATGCTGGA 4690
spPheAlaSerArgCysAsnMetAlaMetValGluLeuGluProValProGluGluAspAspMetLeuGl
GAAGCTGCATCATCACGGCGCGATCTCATGCACAAGGGACGGGTCGACGTCGCGGTGACATGACCCGC 4760
uLysLeuHisHisHisGlyGlyAspLeuMetHisLysGlyArgValAspValSerGlyAspMetThrArg
CATGACGAGGAGCGTCTTACCAGCTGATCTCCAACCATCTGCACTATACGGGCTCCACCCGCGCCAAGC 4830
HisAspGluGluArgLeuTyrGlnLeuIleSerAsnHisLeuHisTyrThrGlySerThrArgAlaLysG
AGATCCTCGATCACTGGGCCGACTACCGTCCGAAGTTCGCAAGGTCAFGCCGGTTCGAATACCGCCGTC 4900
lnIleLeuAspHisTrpAlaAspTyrArgProLysPheArgLysValMetProValGluTyrArgArgAl
GCTCGAGGAAATGGAGCGCAGCCGGATGGGCATTGCCGCGAQTGATTTTCGGCCGGGACATCGGCCCCA 4970
aLeuGluGluMetGluArgSerArgMetGlyIleAlaAlaGluEndPheAlaProGlyHisArgProPro
GTGAACGCAGATGGCCGATGTCGGAACGCTCTCGATGAGCCCGTGACGATCACGCCGGCGGCAAGAAGCC 5040
ValAsnAlaAspGlyArgCysArgLysArgLeuAspGluProValThrIleThrProAlaAlaArgSerA
GTCGAGATCGCCCGAAGTTCACGGGATATGTTCCATGACGGTCAAGAGAAGCAACCCGCCCGGAATAC 5110
rgArgAspArgProGluValProGlyAspMetPheHisAspGlyGlnGluLysGlnProAlaArgAsnTh
CGGGACTGACGACAGACAATTGGCCCGGATTAGCGGGTCATGAGGGTAAAGGACGAAGACATCGGTAAAG 5180
rGlyThrAspAspArgGlnLeuAlaAlaAspEndAlaValMetArgValArgAspGluGluMetGlyLys
GTAACAGGGTTTCTGGAATCGACCGGCAGGTGCCAAGTATCAGCCGGCGTCGGATCGTATCCGCCATT 5250
ValThrGlyPheLeuGluIleAspArgGlnValAlaLysTyrGlnProAlaSerAspArgIleArgHisP
TCCGATGTCGGAATCCGGAAGTGCAGAAACAGGCTGCCGCTGCATGGACTGTGGCATCCCCTATTGCCA 5320
heArgMetSerAspProGluValGlnLysGlnAlaAlaArgCysMetAspCysGlyIleProTyrCysHi
CGGCCCCACCGGCTGCCCGGTGCACAACCAGATTCCCGACTGGAACGACCTCGTCTATAACAACAACCTGG 5390
sGlyProThrGlyCysProValHisAsnGlnIleProAspTrpAsnAspLeuValTyrAsnAsnAsnTrp

GAAGCGGCGATCCAGAACCTGCATTGACCAACAACCTCCCGGAGTTCACCGGCCGCGTCTGCCCCGCC 5460
 GluAlaAlaIleGlnAsnLeuHisSerThrAsnAsnPheProGluPheThrGlyArgValCysProAlaP

CCTGCGAGGAAGCCTGCACCTTGAATCTCGAAGATGCGCCGGTTTGCCATCCAATACGGTGCAGCAGGCG 5530
 roCysGluGluAlaCysThrLeuAsnLeuGluAspAlaProValCysHisProIleArgSerSerArgAr

AATTGCCGAACAAGCCCTATGACTTCGGCTTCATCCCGGCCGAGCCGCCACGGTCCATTACCGGCAAA 5600
 gIleAlaGluGlnGlyLeuEndLeuArgLeuHisProGlyArgSerArgProArgSerIleThrGlyLys

GGTCCCCGTCTTGGTTCGGGTTCCCCCGGAATGGGGGCCCAAATTTGGCCGCCCGCCAAGGTTG 5670
 GlyProArgSerTrpPheGlyPheProProGluTrpGlyProProLysPheGlyArgProAlaLysValA

cTTTTATAAAATTTAAACGACCGGGGGGGTTTCCCTAGGGTTTCCCAAATTTTAAAAAATAAAT 5740
 laPheTyrLysIleEndAsnAspArgGlyGlyPheProLeuGlyPheProLysPheLeuLysLysLysMe

GTTCTGTTTTCCCTTTTTAAAAAAGGGGGGGTTTCCCTCCATGGGTGATTTTTATTTTAAACCA 5810
 tPheCysPheProPheLeuLysLysArgGlyGlyValSerLeuHisGlyValIlePheIleLeuLysPro

GGGGCGCATTTTTATAAAGGAAACAACCGGGGGTGGTGGGTAAGGAATCCGATTTAAGATGGAGA 5880
 GlyGlyIlePheTyrLysGlyLysGlnProGlyGlyTrpTrpGlyLysGluPheArgPheLysMetGluL

AGAATTTGTGATCCCGCTTGGAGAAGATGAAAGGGcCAGGGTTTACTTTCCATTGGGGAGTTCAATTT 5950
 ysAsnPheValIleProLeuGlyGluAspGluArgAlaArgGlyLeuPheSerIleGlyGluPheAsnPh

CGGTCTGAAGTCAAGTTGAGCAGcTGCTGCCGATCATGACCCGTCTTTTACTGCGCGGTTCCGAG 6020
 eGlyLeuGluValLysValGluGlnLeuLeuAlaAspHisAspAlaValPheTyrCysGlyGlySerGlu

ACGCCGCGTAGGCCGGCATTCCGGGTATGACCTTGCCGCGTGCATGATGCCATGCCCTATCTGGTCC 6090
 ThrProArgGluAlaGlyIleProGlyIleAspLeuAlaGlyValHisAspAlaMetProTyrLeuValG

AGCAGAACC GCCGCTCGGGCGCGAGAACATTGACAGCGTCCGGCTGGCCGTCGGATCCAATCTTGCTGG 6160
 lnGlnAsnArgArgValGlyArgGluAsnIleAspSerValGlyTrpProSerAspProIleLeuAlaGl

CGCCAAACATGTCGTCGTTGTCGGCGCGCGATACGGCGTCCGACTGTGTCCGCACGGCGTTCCGCCAG 6230
 yAlaLysHisValValValValGlyGlyGlyAspThrAlaSerAspCysValGlyThrAlaPheArgGln

GGTCCGTCAAAGTCACCCAGCTCGACATCCGGCCGACCCCGGAGAAGGAAGACAAGCTCGCCGTCT 6300
 GlyAlaValLysValThrGlnLeuAspIleArgProGlnProProGluLysGluAspLysLeuAlaValT

GGCCCTTCTGGGCGACGAAGATGCGCACCTCCTCCTCGCAGGCCGAGGGTGCCTCCGCGAGTTCAGGT 6370
 rpProPheTrpAlaThrLysMetArgThrSerSerSerGlnAlaGluGlyAlaValArgGluPheGlnVa

GCGCAGCTCGAATTATCAGCGAAGACCGCGTGTGACCGCGTCAAGTGTGCGAGGTCGACGAGCGC 6410
 lAlaThrLeuGluPheIleGlyGluAspGlyValLeuThrGlyValLysCysCysGluValAspGluArg

CGGCGCCGGTCCCGGCACGGAATTCGTCAATCCGCGCCGATCTCGCCTTCATCGCCATCGGTTCCCGC 6480
 ArgArgProValAlaGlyThrGluPheValIleArgAlaAspLeuAlaPheIleAlaIleGlyPheArgG

GCGCGTTCACAACAAGCGTCTGAAGGAATCGAAGCAAGCTGACCGTCAACACCGACAAGCGCGGCTCG 5550
 lyProPheThrThrSerValLeuLysGluSerLysAlaSerERDArgSerThrProThrSerAlaAlaAr

ACCAATGTCGTCGCCAACGACCGGACTACAAGACCTCGGTTCGACAAGCTCTGGACGCGCGCGATGTGC 5620
 gProMetSerSerProThrThrAlaThrThrArgProArgSerThrSerSerGlyArgArgAlaMetCys

	501		550
<i>gltB E. coli</i>	qkqfnysaee	ldsvirvlge	ngqeavgsmg
<i>gltB A. Bras</i>	qqafgltmed	melilhpvme	dgkeaignsmg
<i>gltB R. etli</i>c
Consenso	-----	-----	-----D-----L-----R
	551		600
<i>gltB E. coli</i>	qqfaqvtnpp	idplreahvm	slatsigrem
<i>gltB A. Bras</i>	qnfsqvtnpp	idslrerrvm	slktrlgnlg
<i>gltB R. etli</i>	hhin.....
Consenso	-----	-----	-----
	601		650
<i>gltB E. coli</i>	lysdfkqltt	mkeehyradt	lditfdvttk
<i>gltB A. Bras</i>	ttaeframrd	ymgdtaaeid	atfpvdggpe
<i>gltB R. etli</i>
Consenso	-----	-----	-----R-G
	651		700
<i>gltB E. coli</i>	tvllvLsDrn	iakdrlpVpa	pmavgaiqtr
<i>gltB A. Bras</i>	athviLtDea	mgparaaIpa	ilatgavhth
<i>gltB R. etli</i>	lhilaFcDre	rakdhfaVag
Consenso	-----L-D-----	-----V-----	-----
	701		750
<i>gltB E. coli</i>	DphhFAVllg	fgaTaiypYl	ayetlgr... ..
<i>gltB A. Bras</i>	DthyFAVlig	vgaTtvnaYl	aqeaiaerhr
<i>gltB R. etli</i>	DqpfFAl... ..	TrchaCq	g...dsrrk
Consenso	D---FA---	---T---Y-	-----L-----K-----
	751		800
<i>gltB E. coli</i>	rnginkgLYK	IMSKMGIS	ti aSYrcsklFE
<i>gltB A. Bras</i>	kkaiddglLK	IMSKMGIS	vi sSYrgggnFE
<i>gltB R. etli</i>qrhFK	VMSKMGIS	ty qSYcgaqiFD
Consenso	-----K	IMSKMGIS--	--SY-----FE AIGL-----V--F-----I
	801		850
<i>gltB E. coli</i>	gGasFedfqq	dllnlskrAW	lar...kpi
<i>gltB A. Bras</i>	sGigLngiqk	kvleqhatAY	nee...vval
<i>gltB R. etli</i>	eGigLeaiae	etvarhnaAF	gkdpllatl
Consenso	-G--L-----	-----A-	-----GG---Y--GE-H-W---
	851		900
<i>gltB E. coli</i>	vVrtLQqAVq	sgeysdYqeY	aklVNerp..
<i>gltB A. Bras</i>	vIhtLQqAVt	ndsytFkky	seqVNkrp..
<i>gltB R. etli</i>	aVaaLQhAVr	rnaedrYreF	aemVNnsair
Consenso	-V--LQ-AV-	-----Y--Y	---VN-----R-LL-----
	901		950
<i>gltB E. coli</i>	VnIaDVEpas	elfkRFdTaa	MSiGalSpEA
<i>gltB A. Bras</i>	VpVgEVEsit	airkRFiTpq	MSmGalSpEA
<i>gltB R. etli</i>	VsIdEVEEpa	divrRFsTga	MSfGsiSrEA
Consenso	V-I-EVE---	----RF-T--	MS-G--S-EA H--L--AMN-IG--S--GEG

	951		1000
<i>gltB E. coli</i>	GEDpaRY... ..Gtnkv..S	rIKQVASGRF	GVtpaYLVna dviqIKVAQG
<i>gltB A. Bras</i>	GEDpaRFrpd knGdnwn..S	aIKQVASGRF	GVtaeYLnqc releIKVAQG
<i>gltB R. etli</i>	GEESdRYmpl sdGsmnperS	aIKQIASGRF	GVtTeYLVna dvlqIKVAQG
Consenso	GED--RY--- --G-----S	-IKQVASGRF	GVT--YL--- ----IKVAQG
	1001		1050
<i>gltB E. coli</i>	AKPGEGGQLP GdKVtpyIaK	lRySvPGVtL	ISPPPHHDIY SIEDLAQLIF
<i>gltB A. Bras</i>	AKPGEGGQLP GfKVtemIaR	lRhStPGVmL	ISPPPHHDIY SIEDLAQLIY
<i>gltB R. etli</i>	AKPGEGGQLP GhKVdatVAK	tRhStPGVgL	ISPPPHHDIY SIEDLAQLIY
Consenso	AKPGEGGQLP G-KV---IA-	-R-S-PGV-L	ISPPPHHDIY SIEDLAQLIY
	1051		1100
<i>gltB E. coli</i>	DLKqVNPkam IsVKLVSepG	VGtIAtGVAK	AyADlItIaG ydGGTGASPl
<i>gltB A. Bras</i>	DLKqINPdak VtVKLVsrsG	IGtIAaGVAK	AnADiIlIsG nsGGTGASpQ
<i>gltB R. etli</i>	DLKnVNptsd VsVKLVSevG	VGtVAaGVAK	ArADhItVaG fdGGTGASPl
Consenso	DLK-VNP--- V-VKLVs--G	VGtIA-GVAK	A-AD-I-I-G --GGTGASP-
	1101		1150
<i>gltB E. coli</i>	sSvKyAGcPW ElGLvEtqQa	LvaNgLRhkI	rLqvDGGLKT GvDIiKaAiL
<i>gltB A. Bras</i>	tSiKfAGlPW EmGLsEvhQv	LtlNrLRhrV	rLrtDGGLKT GrDVIaAmL
<i>gltB R. etli</i>	tSfkhAGsPW EiGLaEtqQt	LvlNgLRsrV	aLqvDGGLKT GrDVIigAlL
Consenso	-S-K-AG-PW E-GL-E--Q-	L--N-LR--V	-L--DGGLKT G-DII--A-L
	1151		1200
<i>gltB E. coli</i>	GAEsFGfgTg pMVAIGCkyl.	RiCHlNnCat	GVatQDdkLR knhYhGlPfk
<i>gltB A. Bras</i>	GAEeFGigTa sLIaMGcimv	RqChsNtCpv	GVcvQDdkLR qk.FvGtPek
<i>gltB R. etli</i>	GADeFGfaTa pLIAaGCimm	RkCHlNtCpv	GVatQDpVLR kr.FkGtPeh
Consenso	GAE-FG--T- -LIA-GC---	R-CH-N-C--	GV--QD--LR ---F-G-P--
		↑ ↑ ↑	
	1201		1250
<i>gltB E. coli</i>	VtNyFeFiAr EtRElMAqLG	vtrLvD....	lIGrtDLLke ldgfta.kqq
<i>gltB A. Bras</i>	VvNIftFIaE EvREiLAgLG	frsLnE....	vIGrtDLLhq vsrgae.hld
<i>gltB R. etli</i>	ViNyPffvAn EvREiLAsLG	ftrLdEthrr	lIGasELLeK demlahwkak
Consenso	V-N-F-F-A- E-RE-LA-LG	---L-E----	-IG--DLL-- -----
	1251		1300
<i>gltB E. coli</i>	kLaLsklLet aEphpgkaLY	ctennppfdn	glLnaqllqq AkPfdErqs
<i>gltB A. Bras</i>	dLdLnprLaq vDp.genarY	ctlqgrnevP	dtLdarivad ArPlfeEgek
<i>gltB R. etli</i>	gLdFsriFhk vDaakeetfW	tsrqghpid.	diLdrvlieq AqPaltDktp
Consenso	-L-L---L-- -D-----Y	-----	--L----- A-P---E---
	1301		1350
<i>gltB E. coli</i>	ktFwfdirNt dRsvGasLSg	yIaqthgdqG	LaadpIkayF nGTAGQSFgV
<i>gltB A. Bras</i>	mqLaynarNt qRaiGtrLsS	mVtrkfgmFG	LppghItirL rGTAGQSLGa
<i>gltB R. etli</i>	vaFevdikNv dRsaGamLSg	eVakryrhrG	LkedtInvTL rGTAGQSFGa
Consenso	--F-----N- -R--G--LS-	-V-----G	L----I----L -GTAGQSFg-
	1351		1400
<i>gltB E. coli</i>	WnagVeLyl tGDaNDYVGK	GMaGgLIaIR	PpvgSafrrsh easIIGNTcL
<i>gltB A. Bras</i>	FavqGikLev mGDaNDYVGK	GLsGGtIvVR	PttsSpletn kntIIGNTvL
<i>gltB R. etli</i>	FlarGVtFnl iGDgNDYVGK	GLsGGkIiIR	PpenSqivae dsiIVGNTvL
Consenso	F---GV-L-- -GD-NDYVGK	GL-GG-I-IR	P---S----- ---IIGNT-L

	1401				1450
<i>gltB E. coli</i>	YGATgGr1Ya	aGrAGERFgV	RNSGaitVVE	GiGdnGCEYM	TGGivcILGk
<i>gltB A. Bras</i>	YGATaGklFa	aGqAGERFaV	RNSGAtvVVE	GcGsnGCEYM	TGGtavILGr
<i>gltB R. etli</i>	YGATeGecYf	rGvAGERFaV	RNSGAiaIVE	GvGdhGCEYM	TGGvvvVLGa
Consenso	YGAT-G--Y-	-G-AGERF-V	RNSGA--VVE	G-G--GCEYM	TGG---ILG-
	1451				1500
<i>gltB E. coli</i>	tGvNFgAGMt	GGfAYVlDes	gdFrkrvNpe	lVevlsV...
<i>gltB A. Bras</i>	vGdNFaAGMt	GGmAYVyDld	dsLplyiNde	sVifqrI...
<i>gltB R. etli</i>	tGrNFaAGMs	GGvAYVlDea	gdFasrcNma	mVelepVpee	ddmleklhhh
Consenso	-G-NF-AGM-	GG-AYV-D--	--F----N--	-V----V---	-----
	1501				1550
<i>gltB E. coli</i>Dalaih	EehLrgLlTe	HvqhTgSqrq	eeILanWstf
<i>gltB A. Bras</i>E.vghy	EsqLkhLlEe	HvteTqSrfa	aeILndWare
<i>gltB R. etli</i>	ggdlmhkgrv	dvsgDmtrhd	EerLyqLIsn	HlhyTgStra	kqILdhWady
Consenso	-----	----D----	E--L--LI--	H---T-S---	--IL--W---
	1551				1600
<i>gltB E. coli</i>	atKFalVkPk	ssDvkallGh	rsrsaaelrv	qaq.....
<i>gltB A. Bras</i>	vtKFwqVvPk	..EmlnrLev	pvhlpkaisa	e.....
<i>gltB R. etli</i>	rpKFrkVmP.	.vEyrraLee	mersrmgiaa	efapghrppv	nadgrcrkrl
Consenso	--KF--V-P-	--E----L--	-----	-----	-----

Como podemos observar en la Fig. 13, 208 nucleótidos abajo de la secuencia terminal del gene *gltB* encontramos el posible inicio del gene *gltD*. En la Fig. 15 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de este gene con sus homólogos de *E. coli* y *A. brasilense*, con los cuales revela una similitud del 50% y una identidad del 30%. Así mismo presenta dos motivos altamente conservados como son: entre los aminoácidos 47 y 115 dos grupos de cisteínas potencialmente involucrados en la formación de centros 4Fe-4S y entre los residuos 300 y 330 una región propuesta como el sitio de pegado del NADPH (Pelanda *et al.*, 1993).

Figura 15. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de las subclonas pIA-8 y pIA-E contra la subunidad chica *gltD* de *E. coli* y *A. brasiliense*. La línea horizontal marca el motivo de pagado del NADPH y las flechas indican la posición de los residuos de cisteínas.

	1				50
<i>gltD E. coli</i>	.msqnvvyqFi	dlqrvdppkk	PlkiRkiefv	eiyepfSEgq	akaQAdRCls
<i>gltD A. bras</i>	manqrmlgFv	htaqrmpdkr	PaaeRrqdfa	eiyaRfSDer	aneQANRCsq
<i>gltD R. etli</i>	eemgkvtgFl	eidrqvakyq	PasDR.....	...irmSDpe	vqkQAARCmd
Consenso	-----F-	-----	P--R----	-----SD--	---QA-RC--
					↑
	51				100
<i>gltD E. coli</i>	CGnPYCewk.	.CPVhNyIPn	WlKlanegri	feAaelshqT	NtLPEvcGRV
<i>gltD A. bras</i>	CGVpFCqvh.	.CPVsNnIPd	WlKltsegrl	eeAyevsqaT	NnFPEicGRI
<i>gltD R. etli</i>	CGiPYChgpt	gCPVhNqIPd	WnDLvynnw	eaAiqnlhsT	NnFPEftGRV
Consenso	CG-PYC----	-CPV-N-IP-	W--L-----	--A-----T	N-FPE--GRV
	↑	↑	↑		
	101				150
<i>gltD E. coli</i>	CPqdr1CEgs	Ctlnd.efga	vtignieryI	nDkaFemgwr	pdmsgvkgtg
<i>gltD A. bras</i>	CPqdr1CEgn	Cviegsthga	vtigsvekyI	nDtaWdggwv	kprtpsrelg
<i>gltD R. etli</i>	CPap..CEea	Ctlndledapv	chpirsrrrI	aEqGLsrlh	pgsrprsit
Consenso	CP---CE--	C-----	-----I	-D-----	-----
	↑	↑	↑		
	151				200
<i>gltD E. coli</i>	kkvaiigaGp	aglacadvLt	rngvkavvFd	rhpeiGG1Lt	FGipa.....
<i>gltD A. bras</i>	lsvgvigaGp	aglaaaeeLr	akgyevhvYd	rydrmgGLLv	YGipg.....
<i>gltD R. etli</i>	gkgprswfGf	ppewgppkFg	rpa.kvafYk	iyndrGG.Fp	LGpggwwxke
Consenso	-----G-	-----L-	-----Y-	-----GG-L-	-G-----
	201				250
<i>gltD E. coli</i>	..FKLEKevm	trrreiftgm	Giefklntev	GrDvqlddLl	sdydAVflgv
<i>gltD A. bras</i>	..FKLEKsvv	errvkllda	Gviihpnfev	GrDaslpeLr	rkhvAVlvat
<i>gltD R. etli</i>	frFKMEKnfx	iplgederar	Glxsigefnf	GEvkveqLl	adhAVxycg
Consenso	--FKLEK--	-----	G-----	G-D-----L-	----AV----
	251				300
<i>gltD E. coli</i>	Gtyqsmrggl	enedadgVya	AlpFLiantk	qlmg.fgE..	tRdepfvsm
<i>gltD A. bras</i>	Gvykardika	pgsglgnIva	ALdYLttsnk	vslgdtvE..	aYengslnaa
<i>gltD R. etli</i>	Gsetpreagi	pgidlagVhd	AMpYLvqqnr	rvgreniDsv	gtwpsdpilag
Consenso	G-----	-----V--	AL-YL-----	-----E--	-----
	301				350
<i>gltD E. coli</i>	gKrVVV1GGG	DTAmDCVrTs	vRQGakhVtc	ayrrdeenmp	gsrrevknar
<i>gltD A. bras</i>	gKhVVV1GGG	DTAmDCVrTa	iRQGatsVkc	lyrrdrknmp	gsqrevahae
<i>gltD R. etli</i>	arhVVVvGGG	DTAsDCVgTa	fRQGAvkVt.
Consenso	-K-VVV-GGG	DTA-DCV-T-	-RQGA--V--
					↑

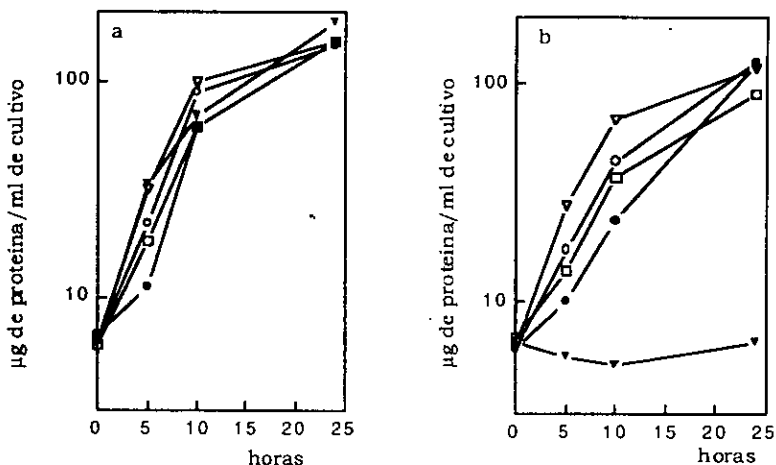
	351		400
<i>gltD E. coli</i>	eegvefkFnv qPlgievngn gkVsgvkmvr temgepdAkG rrraeivags		
<i>gltD A. bras</i>	eegvefiWqa aPegf..tgd tvVtgvrvavr ihlgvadAtG rqtppqviags		
<i>gltD R. etli</i>qLdi rPqppekedk laVwpfwatk mrtsssqaEGavr		
Consenso	----- -P----- --V----- -----A-G -----		
	401		450
<i>gltD E. coli</i>	EhiVpadavi mafgfrphnm ew.lakhsve ldsqgriiap egsdnafqts		
<i>gltD A. bras</i>	EftVqadlvi kalgfepedl pnafepelek vtrwgtllvd hrtek...mtn		
<i>gltD R. etli</i>	EfqVatlpr		
Consenso	E--V-----		
	451		497
<i>gltD E. coli</i>	npkifaggdi vrgsdlvta iaegrkaadg imnwlev...		
<i>gltD A. bras</i>	mdgvfaagdi vrgaslvwva irdgrdagrg hprlrqgegr gtgcrgg		
<i>gltD R. etli</i>		
Consenso	-----		

2) Caracterización fisiológica de la mutante TAD12

Ha sido reportado que mutantes en GOGAT de *E. coli* (Pahel *et al.*, 1978), de *K. aerogenes* (Brenchley *et al.*, 1973) y de *S. typhimurium* (Madonna *et al.*, 1985), tienen afectada su capacidad para metabolizar diferentes aminoácidos, reflejándose esto en un nulo o pobre crecimiento en medio mínimo suplementado con dichos aminoácidos. Para *E. coli* este fenómeno está directamente relacionado a que una mutación en los genes estructurales de la GOGAT es polar para el gene *gltF* el cual está involucrado en la inducción de la respuesta Ntr (Castaño *et al.*, 1992). Tomando en cuenta estos reportes, se evaluó la capacidad de la mutante TAD12 de *R. etli* para utilizar los siguientes aminoácidos como única fuente de nitrógeno: glutamato, histidina, prolina, arginina, glutamina y serina (Figs. 16 y 17). Como se puede observar en las Figs. 16b y 17 la mutante TAD12 presentó un aumento en su tiempo de duplicación de 2.5 horas a 4 horas comparada con la cepa silvestre. Estos resultados indican una deficiencia de la mutante para metabolizar la mayoría de estos aminoácidos que le permitan un crecimiento normal en MM. Sin embargo, cabe mencionar que esta mutante fue incapaz de metabolizar la serina, lo que probablemente se debe a que este aminoácido al ser degradado produce amonio.

Figura 16. Utilización de diferentes aminoácidos como única fuente de nitrógeno por las cepas a) CE3 y b) TAD12.

○ Prolina ● Glutamato ▼ Histidina ▽ Serina □ Arginina



2.1) Pozas intracelulares de aminoácidos

Con el fin de conocer la distribución del nitrógeno amino en ausencia de la única vía de asimilación en *R. etli*, GS/GOGAT, se midieron las pozas de aminoácidos intracelulares en la mutante TAD12 y en la cepa silvestre CE3 crecidas en cultivos de MM(Succ)+Gln 10mM (Fig. 17). Al no estar presente la actividad de GOGAT la síntesis de glutamato se reduciría y de ahí los otros aminoácidos también, reduciéndose el metabolismo nitrogenado general de la cepa. En la Tabla 3 se muestran los resultados de estas determinaciones. Considerando primeramente las pozas intracelulares de glutamina y de glutamato, las cuales están directamente relacionadas con la actividad de la GOGAT, podemos observar que a las 12 horas la concentración de glutamina en la mutante es 14 veces menor y la concentración de glutamato es 53

veces menor con respecto a la CE3. En cambio a las 24 horas, las concentraciones de glutamina y glutamato en la mutante son 10 y 5 veces mayor respectivamente, con respecto a la CE3. Las concentraciones intracelulares de otros aminoácidos en la mutante TAD12 son prácticamente iguales a las de la CE3, tanto a las 12, como a las 24 horas. Las determinaciones del nitrógeno amino total muestran que la mutante TAD12 éste se encuentra reducido a niveles muy bajos durante las primeras 12 horas de crecimiento; sin embargo, la concentración de nitrógeno amino total se incrementa a las 24 horas. Como era de esperarse el contenido de nitrógeno amino de una cepa carente de la actividad de GOGAT se ve disminuido a las 12 horas de crecimiento, sin embargo a las 24 horas aumenta su capacidad de acumular nitrógeno amino, lo que nos sugiere que no utiliza bien los aminoácidos, en este caso la glutamina como fuente de carbono (Encarnación *et al.*, 1997), lo cual explica su acumulación y de ahí la síntesis de glutamato que podría ser por otras enzimas como las glutaminasas (Durán y Calderón, 1995).

Figura 17. Crecimientos en MM+Gln (10 mM) como única fuente de nitrógeno de las cepas
 ○ CE3 ● TAD12

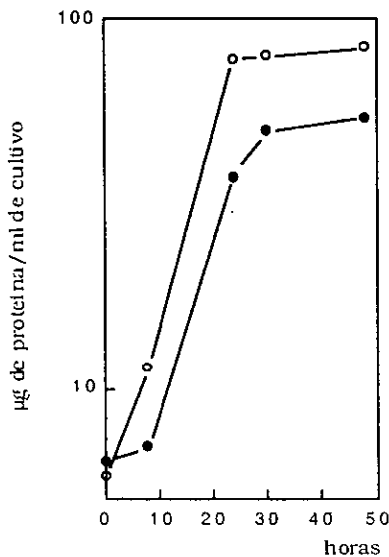


Tabla 3. Concentración intracelular de aminoácidos^a y de nitrógeno amino total en las cepas TAD12 y CE3 cultivadas en MM+Gln

CEPA		Glutamina	Glutamato	Otros aminoácidos ^b	Nitrógeno amino total
12 hr	CE3	90.2	21.2	7.2	210.0
	TAD12	6.5	0.4	5.0	18.9
24 hr	CE3	4.4	2.3	53.8	67.4
	TAD12	45.0	10.7	58.9	163.5

a. nmol/mg de proteína

b. La suma de la concentración de: aspartato, serina, treonina, glicina, alanina, valina, fenilalanina, metionina, leucina y lisina

3) Caracterización simbiótica de la mutante TAD12

Mutantes en GOGAT de *R. meliloti* conservan su capacidad de nodular (Nod⁺) y fijar nitrógeno (Fix⁺) en plantas de alfalfa (Kondorosi *et al.*, 1977; Lewis *et al.*, 1990), mientras que mutantes de *A. caulinodans* o de *B. japonicum* presentan un fenotipo Nod⁺ Fix⁻ (Hilgert *et al.*, 1987; O'Gara *et al.*, 1984). Con el fin de determinar el fenotipo simbiótico de una cepa deficiente en GOGAT de *R. etli*, se llevaron a cabo diferentes experimentos de inoculación de plantas de frijol con la mutante TAD12 y la cepa silvestre CE3.

3.1) Fenotipo simbiótico

Tomando en cuenta los antecedentes presentados en los trabajos de Kondorosi *et al.* (1977) y Lewis *et al.* (1990) nosotros no esperábamos encontrar un fenotipo simbiótico para una cepa de *R. etli* deficiente en la

actividad de GOGAT. Los resultados de uno de los cuatro experimentos representativo de plantas inoculadas con la mutante y con la cepa silvestre se muestra en la Fig. 18. En esta figura se presentan los estudios realizados a diferentes tiempos de postinoculación sobre el desarrollo de nódulos, la fijación de nitrógeno y el crecimiento de las plantas. Los nódulos desarrollados por la mutante emergen al mismo tiempo y en la misma cantidad que los inducidos por la cepa silvestre. La actividad específica de la nitrogenasa en los nódulos desarrollados en plantas inoculadas con la mutante se incrementa constantemente durante la simbiosis con respecto a la que se presenta en las plantas inoculadas con la cepa silvestre. Este incremento para los 18 dpi es de 23%, para los 25 dpi de 49% y para los 39 dpi de 45%. No obstante el incremento en la actividad de la nitrogenasa, el crecimiento de las plantas se mantuvo en las mismas proporciones para ambas cepas (Fig. 18). Los resultados de nuestro trabajo indican que una cepa mutante en GOGAT de *R. etli* favorece la fijación de nitrógeno, lo que se comprueba por los valores mayores de la actividad de la nitrogenasa en comparación con la cepa silvestre CE3.

3.2) Contenido de ureidos en el xilema.

Para conocer el contenido de metabolitos nitrogenados que se transportan a la planta por los vasos del xilema, que son ureidos, éstos se determinaron en plantas de frijol inoculadas con las cepas TAD12 y CE3, de acuerdo a la técnica descrita en material y métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 4, a los 18 dpi podemos observar que la concentración de ureidos en las plantas inoculadas con la mutante muestra sólo un 85% de la concentración encontrada en las plantas inoculadas con la cepa silvestre, pero después de los 25 y hasta los 39 dpi hay un incremento que llega a ser de hasta un 100%. Los resultados obtenidos son consistentes con los encontrados en la actividad de la nitrogenasa, a mayor fijación de nitrógeno mayor transporte del mismo a través del xilema de la planta.

Figura 18. Nodulación, actividad específica de nitrogenasa y crecimiento de plantas de frijol inoculadas con las cepas TAD12 y CE3. a) La nodulación está expresada en gramos de peso seco de nódulos por planta. b) La actividad específica de nitrogenasa está expresada en μmol de etileno por hora por peso seco de nódulo. c) El crecimiento de planta está expresado en gramos de peso seco por planta. Los asteriscos indican aquellos casos en que la media de las muestras son significativamente diferentes con un nivel de confiabilidad de $P=0.05$

CE3 TAD12

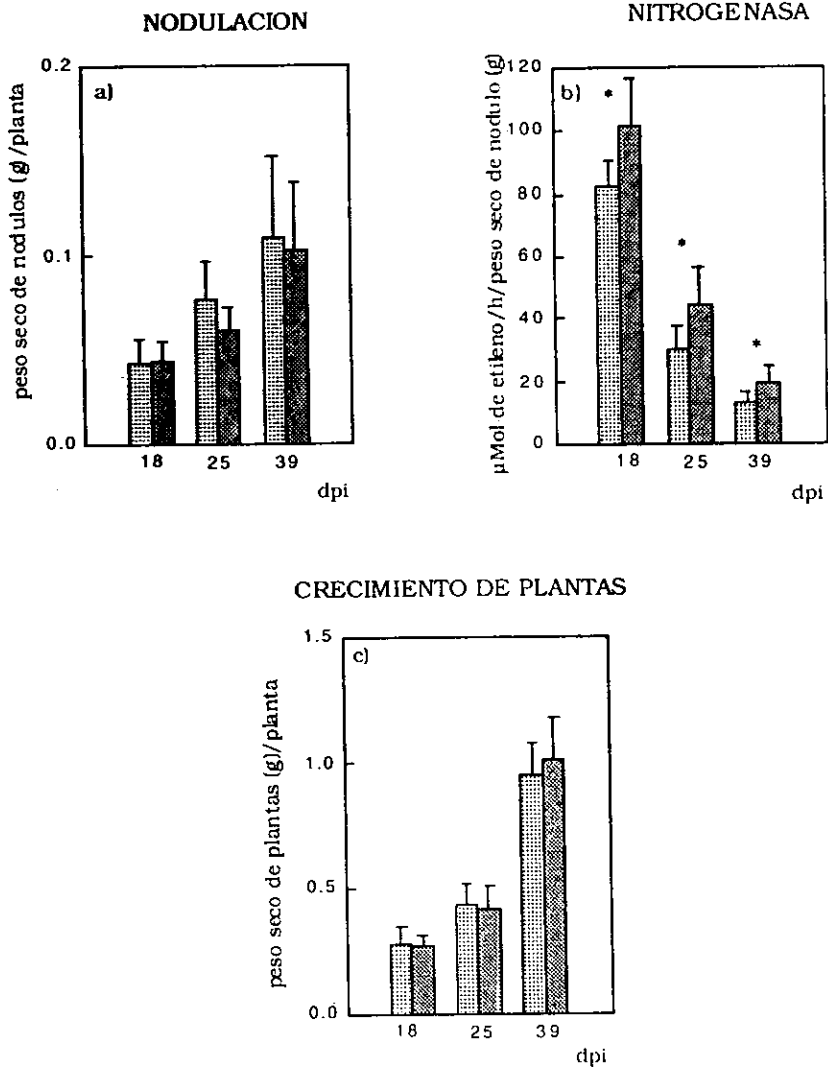


Tabla 4. Porcentaje* de la concentración de ureidos en los vasos del xilema de plantas de frijol inoculadas con la CE3 y con la mutante TAD12. El número entre paréntesis indica la desviación estándar.

dpi ^a	Cepa	Ureidos (mMol)	(%)
18	CE3	0.1415 (±0.0120)	100
	TAD12	0.1200 (±0.0141)	85
25	CE3	0.0830 (±0.0297)	100
	TAD12	0.1355 (±0.0163)	157
32	CE3	0.1020 (±0.0255)	100
	TAD12	0.1050 (±0.0350)	103
39	CE3	0.1005 (±0.0148)	100
	TAD12	0.1120 (±0.0198)	111

* Promedio de tres experimentos independientes.

^a Dias-postinoculación

3.3) Contenido de nitrógeno en plantas y semillas

Los resultados del contenido de nitrógeno total en plantas inoculadas con la mutante TAD12 se muestra en la tabla 5. Podemos observar que la concentración del nitrógeno total en plantas inoculadas con la mutante muestra un incremento desde los primeros 18 dpi (45%) hasta los 39 dpi (46%) con respecto a la concentración del nitrógeno encontrado en plantas inoculadas con la cepa CE3. Al normalizar los valores con el peso seco de la planta y expresarlos en miligramos de nitrógeno total por miligramo de peso seco de la planta, el incremento fué de 18% en todos los tiempos comparado con la cepa silvestre.

Al mismo tiempo se determinó el contenido de mg de nitrógeno en semillas por planta obtenidas de la cosecha de plantas inoculadas con cada una de las cepas y se encontró que las semillas de las plantas inoculadas con la cepa TAD12 presentaron un incremento del 17% con respecto al de las semillas de las plantas inoculadas con la cepa silvestre CE3 (Tabla 6). El incremento en la concentración de nitrógeno tanto en plantas como en semillas son consistentes con los resultados obtenidos en la actividad de nitrogenasa y en el contenido de ureidos en el xilema de las plantas inoculadas con la cepa TAD12 en comparación con la cepa silvestre CE3.

Tabla 5. Nitrógeno* en plantas de frijol inoculadas con la cepa CE3 y con la mutante TAD12. Los números entre paréntesis indican la desviación estándar.

dpi ^a	Cepa	mg de nitrógeno/ planta (%)	mg de nitrógeno/mg de peso seco de planta (%)
18	CE3	8.53 (±1.61)	100
	TAD12	12.14 (±0.96)	145
25	CE3	17.72 (±3.24)	100
	TAD12	21.92 (±2.81)	124
32	CE3	30.90 (±2.87)	100
	TAD12	36.06 (±3.71)	117
39	CE3	33.99 (±3.07)	100
	TAD12	49.59 (±3.30)	146

* Promedio del porcentaje de tres experimentos independientes.

^a Días-postinoculación.

Tabla 6. Nitrógeno* en semillas de frijol en plantas inoculadas con la cepa CE3 ó con la TAD12

Cepa	mg de nitrógeno/mg de semilla		mg de nitrógeno en semilla/ planta	
		(%)		(%)
CE3	0.0375 (± 0.0015)	100	21.13 (± 1.96)	100
TAD12	0.0437 (± 0.0030)	117	24.16 (± 2.91)	114

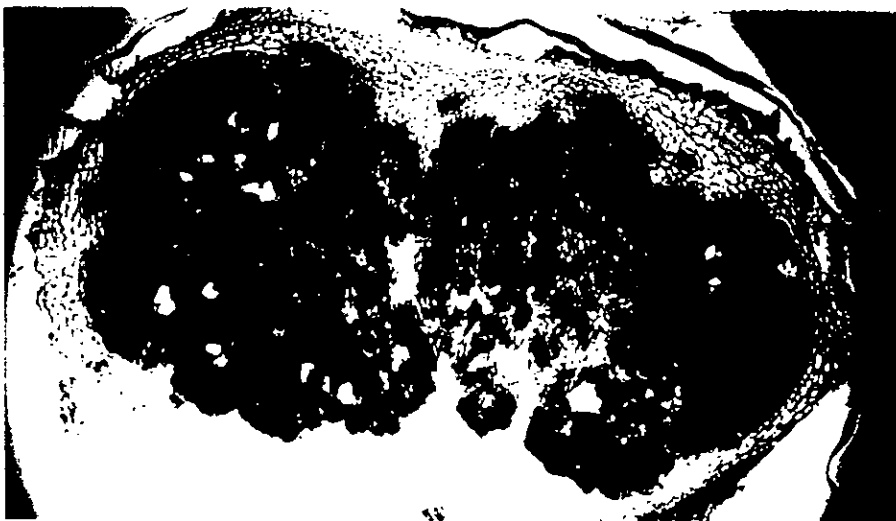
* Promedio del porcentaje de tres experimentos independientes.

3.4) Microscopía óptica y electrónica de nódulos.

En la Fig. 19 se muestran cortes longitudinales observados en el microscopio de luz de nódulos formados por las cepas CE3 y TAD12, donde se puede observar que no existen diferencias estructurales obvias entre ambos. Las microfotografías (Fig. 20) indican que tanto los simbiosomas, los bacteroides y la presencia de gránulos de PHB son muy similares entre la mutante y la cepa CE3, lo cual nos indica que la mutación en GOGAT no genera ningún tipo de alteración estructural en los nódulos y bacteroides.

Figura 19. Corte transversal de nódulos formados en plantas de frijol infectadas con la cepa CE3 o con la mutante TAD12 observadas a través del microscopio óptico. a) Nódulo formado por la cepa CE3 y b) nódulo formado por la mutante TAD12.

a)



b)

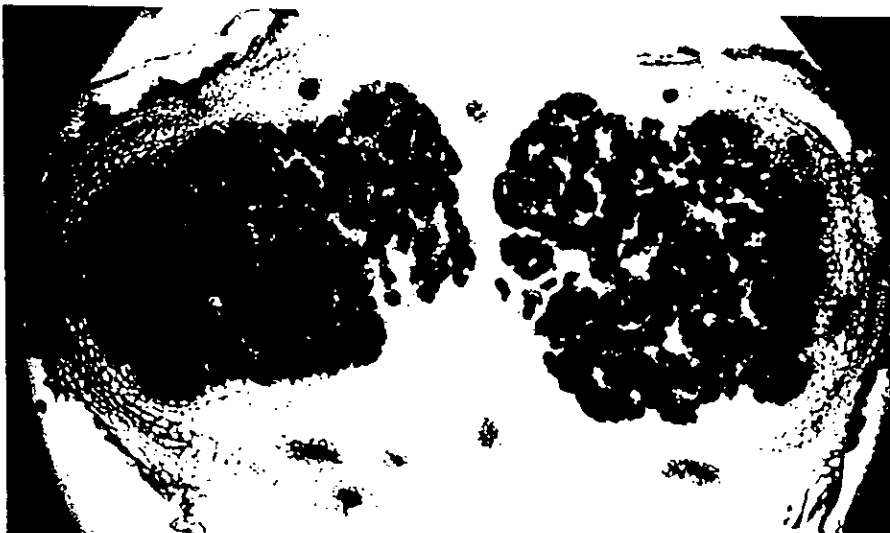
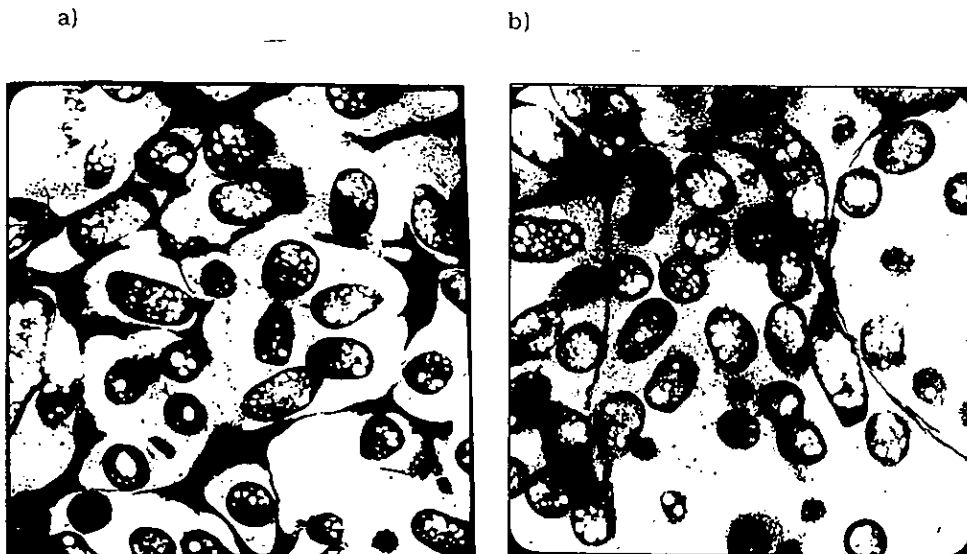


Figura 20. Micrografía electrónica de tejido infectado en nódulos formados en plantas de frijol infectadas con las cepas CE3 y TAD12. a) Electromicrofotografía del tejido infectado en un nódulo formado por la cepa silvestre CE3; b) Electromicrofotografía del tejido infectado en un nódulo formado por la mutante TAD12.



3.5) Concentración de aminoácidos en bacteroides

Para conocer el metabolismo nitrogenado en el bacteroide, tanto en la mutante TAD12 como en la cepa silvestre, se midieron las pozas de aminoácidos presentes. Los resultados de uno de cuatro los experimentos se muestran en la Tabla 7, donde se puede apreciar que a los 18 dpi se encuentran presentes los aminoácidos glutamina y glutamato en los bacteroides de la TAD12 aunque en menor concentración en comparación con la cepa silvestre (43 y 89%, respectivamente); la concentración de otros aminoácidos para la cepa TAD12 esta reducida a un 32% con respecto a la CE3. Sin embargo, a los 25 dpi las concentraciones tanto de la glutamina,

como del glutamato y de los otros aminoácidos se incrementan notablemente en la cepa TAD12. Para los 39 dpi las concentraciones de glutamato y de otros aminoácidos vuelven a bajar representando sólo el 73% de las concentraciones encontradas en la cepa CE3 y la concentración de la glutamina se encuentra en las mismas proporciones en ambas cepas. El contenido de nitrógeno amino total de tres de los cuatro experimentos realizados se muestra en la Fig. 21, en donde se observa la diferencia de la concentración de nitrógeno amino total entre cada cepa, con la tendencia a ser más baja para la mutante que para la cepa silvestre. Sólo en un experimento las concentraciones permanecen similares para ambas cepas (datos no presentados).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos de las concentraciones de nitrógeno amino total en bacteroides podemos observar que en la cepa TAD12 existe una tendencia a ser menor que la cepa silvestre CE3, lo cual nos sugiere que la GOGAT participa en la asimilación de amonio en los bacteroides.

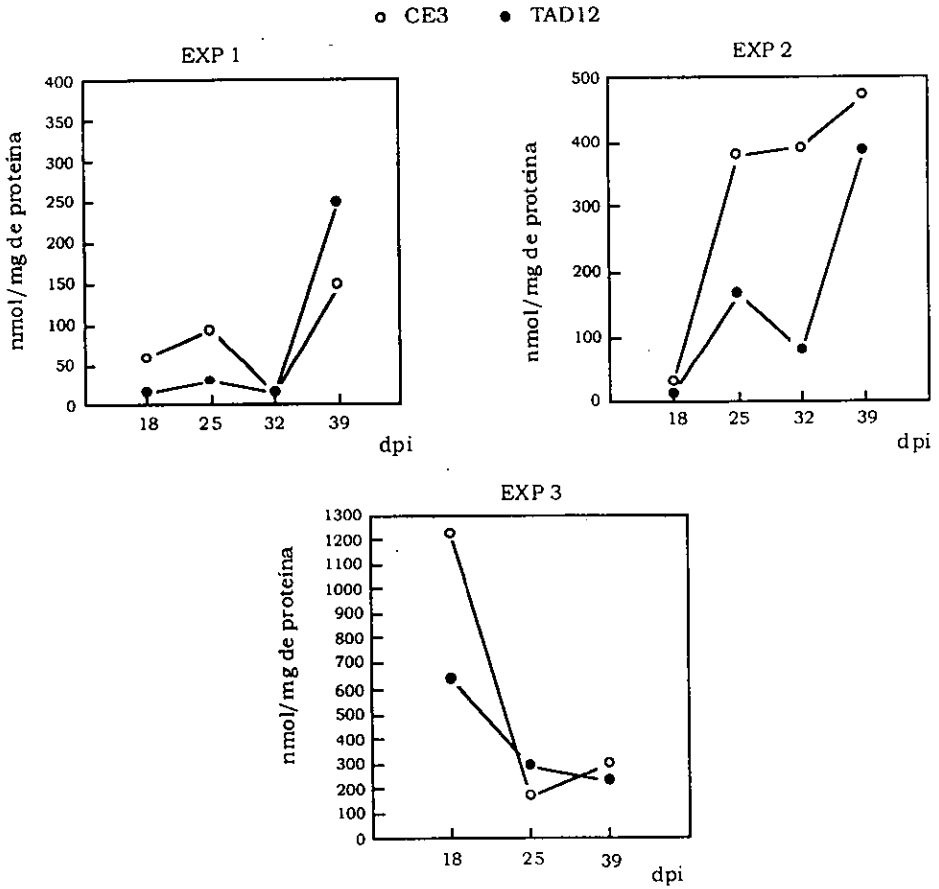
Tabla 7. Concentración de aminoácidos^a en bacteroides aislados de nódulos de plantas inoculadas con las cepas CE3 y TAD12

dpi	CEPA	glutamina	glutamato	Otros aminoácidos ^b
18	CE3	16.0	356.1	780.2
	TAD12	6.9	316.3	246.1
25	CE3	1.7	116.4	48.3
	TAD12	2.7	156.7	104.0
39	CE3	19.0	99.2	138.2
	TAD12	18.9	71.9	101.4

a. nmol/mg de proteína

b. la suma de la concentración de otros aminoácidos tales como aspartato, serina, treonina, glicina, alanina, arginina, fenilalanina, valina, metionina, isoleucina, leucina y lisina

Figura 21. Concentración de nitrógeno amino total en bacteroides aislados de nódulos formados en plantas inoculadas con la mutante TAD12 y con la cepa CE3.



3.6) Datos preliminares de viabilidad, contenido de bacterias en nódulos y concentración de proteínas en bacteroides de la mutante TAD12.

Dado los resultados obtenidos de contenido de nitrógeno amino en bacteroides, como un primer ensayo se hicieron conteos de viabilidad y de concentración de proteína para bacteroides formados a partir de la cepa CE3 y de la mutante TAD12 a diferentes tiempos durante la simbiosis, para determinar si el nitrógeno presente en los bacteroides de la mutante TAD12 podría provenir de la degradación de proteínas. Para determinar la viabilidad de los bacteroides de la mutante TAD12, los bacteroides de nódulos formados en plantas de frijol inoculadas con las cepas TAD12 y CE3 fueron aislados, contados en cámara de Neubauer, plaqueados en cajas de PY con los respectivos antibióticos y se les determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. Los resultados del porcentaje de viabilidad de ambas cepas en general muestran una viabilidad de alrededor del 10%. El contenido de proteína presente a los 18 dpi en los bacteroides de los nódulos formados a partir de la cepa TAD12 es el 37% del contenido de los bacteroides formados a partir de la cepa CE3. Después de 25 dpi la cantidad de proteína de la cepa TAD12 aumenta, representando un 49% de la presente en la cepa CE3 y a los 39 dpi la cantidad de proteína en la cepa TAD12 llega a ser igual que en la cepa silvestre CE3 (Tabla 8) y estas variaciones son proporcionales a las células formadoras de colonias.

Al analizar la concentración específica del nitrógeno amino presente en los bacteroides de la mutante TAD12 se observa una reducción de 2 veces con respecto a la cepa silvestre CE3 en los primeros 18 dpi, sin embargo la cantidad total se ve disminuida 6 veces debido a que la cantidad de proteína total presente en los bacteroides de la mutante es tres veces menor que la de la cepa CE3 (Tabla 9). A los 25 dpi, la concentración de nitrógeno amino total y específica disminuyen en ambas cepas como resultado de que disminuye el nitrógeno amino total y aumenta la proteína 2 y 3 veces en la cepa silvestre y la mutante TAD12, respectivamente (Fig 22, Exp 3); aunque en la mutante TAD12 se observa un aumento de 2 veces comparado con la

cepa CE3, la concentración específica se mantiene igual debido a que la concentración de proteína para la mutante se ve disminuida 2 veces con respecto a la CE3 (Tabla 9). A los 39 dpi las concentraciones de nitrógeno amino total en ambas cepas se mantienen similares y la concentración específica es la misma ya que la cantidad de proteína y el nitrógeno amino total presentes en los bacteroides de ambas cepas es igual, sin embargo en la cepa silvestre la cantidad de proteína disminuye y aumenta en la mutante TAD12 (Tabla 8 y 9). Por otro lado, las bacterias viables presentes en el nódulo son a los 18 dpi 3 veces menos en la mutante TAD12 que en la cepa silvestre CE3, sin embargo a los 25 dpi es de sólo 2 veces para la mutante TAD12 e iguales en ambas cepas a los 39 dpi (Tabla 8).

Tabla 8. Viabilidad, contenido de proteína presente en bacteroides aislados de nódulos formados en plantas inoculadas con las cepas CE3 o TAD12

dpi	Cepa	Células formadoras de colonias	Concentración de proteína en bacteroides (mg/5 plantas)	
				%
18	CE3	1.17 X 10 ⁸	3.70	100
	TAD12	3.9 X 10 ⁷	1.37	37
25	CE3	4.47 X 10 ⁸	7.98	100
	TAD12	2.38 X 10 ⁸	3.89	49
39	CE3	1.14 X 10 ¹⁰	4.86	100
	TAD12	1.27 X 10 ¹⁰	5.16	106

Tabla 9. Nitrógeno amino total y proteína presentes en bacteroides aislados de nódulos formados en plantas inoculadas con las cepas CE3 o TAD12

dpi	Cepa	Nitrógeno amino total	Concentración de proteína de bacteroides %	Concentración de Nitrógeno amino total ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)
18	CE3	1.23	100	1.23
	TAD12	0.64	37	0.21
25	CE3	0.17	100	0.17
	TAD12	0.29	49	0.15
39	CE3	0.30	100	0.30
	TAD12	0.23	106	0.23

Los resultados preliminares de estos estudios nos sugieren que la disminución en el nitrógeno amino presente en bacteroides de la mutante TAD12 a los 18 dpi es debido a que se presenta una disminución en el número de bacteroides presentes en los nódulos, lo cual nos sugiere que la actividad de la GOGAT al principio de la simbiosis es importante para la duplicación de la bacteria antes de invadir los nódulos, pero después la actividad de esta enzima dentro del bacteroide ya no es necesaria ya que conforme pasan los dpi el nitrógeno amino y la cantidad de bacteroides de la mutante llega a ser igual que la cepa silvestre.

DISCUSION

A la fecha sólo han sido reportados un par de trabajos donde se menciona la clonación de los genes que codifican para la glutamato sintasa en Rhizobaceas. Uno de ellos es presentado por Hilgert *et al.* (1987) en donde la complementación de una mutante en *gltBD* en *A. caulinodans*, permitió clonar el locus *glt*, sin embargo, su caracterización quedó incompleta debido que no se secuenció esta región. El segundo trabajo fue reportado por Lewis *et al.* (1990) donde se seleccionó un cósmido de *R. meliloti* capaz de complementar la mutante de *E. coli* PA340. De la misma forma que para los genes de *A. caulinodans*, Lewis sólo reporta el mapa de restricción indicando la posible localización del operón de la GOGAT dentro del cósmido. De acuerdo a lo anterior vale la pena enfatizar que el trabajo realizado y presentado en esta tesis reporta la GOGAT de *Rhizobium etli* clonada y caracterizada desde su organización genética y su secuencia, hasta el estudio de su participación en el metabolismo nitrogenado en vida libre y durante la simbiosis con plantas leguminosas.

En este trabajo se clonaron los genes *gltBD* que codifican para la glutamato sintasa (GOGAT) en *R. etli*. Se caracterizaron dos cepas diferentes derivadas de la CE3 con inserciones del Tn5 (TAD11 y TAD12) como mutantes auxótrofas de glutamato que no crecen en MM con amonio como única fuente de nitrógeno. Este fenotipo concuerda con lo descrito para mutantes *Asm⁻* de *K. pneumoniae* (Nagatani *et al.*, 1971), para mutantes en GOGAT de *E. coli* (Pahel *et al.*, 1978) y es similar al reportado para otras mutantes en GOGAT de Rhizobaceas tales como *R. meliloti* (Kondorosi *et al.*, 1977), *B. japonicum* (O'Gara *et al.*, 1984) y *A. caulinodans* (Donald y Ludwig, 1984). Estas últimas carecen de una GDH funcional y dependen completamente de la vía GS-GOGAT para asimilar amonio tanto en vida libre como en simbiosis (Bravo y Mora., 1988; Kondorosi *et al.*, 1977; Ludwig 1978; O'Gara *et al.*, 1984; Osburne y Signer, 1980). Las mutantes de *R. etli*. TAD11 y TAD12, fueron complementadas con el plásmido pHB10 (fragmento de 12 Kb de DNA que contiene el locus *glt* de *A. caulinodans*)

(Hilgert *et al.*, 1987). De acuerdo con las secuencias nucleotídicas de los fragmentos donde se insertó el Tn5 en cada mutante, se determinó que sólo en la mutante TAD12 la inserción se encuentra en la región carboxilo terminal del gene *gltB*. Para la mutante TAD11 la inserción del Tn5 no se encontró en los genes estructurales, pero sería interesante determinar la causa por lo que produce auxotrofia por glutamato.

Una vez caracterizada la mutante TAD12 como una cepa carente de la actividad en la GOGAT (Tabla 2), se llevaron a cabo los experimentos de complementación con el banco genómico de *R. etli* (Fig. 11) para clonar los genes *gltBD* (Fig. 16).

El fragmento mínimo funcional que codifica para la GOGAT de *R. etli* fué subclonado en un fragmento *BglII* de 12.2 Kb (plásmido pAC22) dentro del cual, los genes *gltB* y *gltD* se encuentran ubicados en una región de aproximadamente 7 Kb (Fig. 14). En el operón *glt* de *E. coli* se transcribe primero el gen *gltB* (de 4544 nucleótidos) que codifica para la subunidad grande, después *gltD* (de 1415 nucleótidos) que codifica para la subunidad pequeña y la distancia que hay entre el codón de terminación de *gltB* y el primer ATG de *gltD* es de 12 nucleótidos (Oliver *et al.*, 1987). La organización del locus *glt* en *A. brasilense* difiere al de *E. coli*: primero se transcribe *gltD* (de 1445 nucleótidos), después *gltB* (de 4547 nucleótidos) y la separación entre ambos es de 141 nucleótidos (Pelanda *et al.*, 1993). La organización del locus *glt* en *R. etli* es similar a la de *E. coli*: primero encontramos a la subunidad grande (*gltB* de aproximadamente 4600 nucleótidos), seguido de la subunidad pequeña (*gltD* de aproximadamente 1400 nucleótidos), sin embargo, es interesante resaltar que la distancia entre los dos genes es de aproximadamente 208 nucleótidos, lo cual permitiría que el gene *gltD* tuviera su propio promotor. La caracterización de la región hacia arriba del gene *gltB* ha sido analizada sólo parcialmente, encontrándose posibles regiones promotoras dependientes de sigma 70, pero éstas quedan en la posición -286 arriba del primer ATG, por lo que se tiene que caracterizar mejor esta región para identificar el promotor y si es que se encuentran secuencias consenso de pegado de proteínas reguladoras.

En el operón *gltBDF* de *E. coli* el promotor se encuentra localizado del nucleótido 132 al 155 arriba del primer ATG, inmediatamente antes del inicio de transcripción (Oliver *et al.*, 1987).

Las secuencias de aminoácidos deducidas para los genes *gltBD* de *R. etli* fueron comparadas con las ya reportadas para los genes *gltBD* de *E. coli* (Oliver *et al.*, 1987) y de *A. brasilense* (Pelanda *et al.*, 1993). La subunidad grande en *R. etli* presenta una similitud del 64% y una identidad del 44.8% con *E. coli* y una similitud del 63% y una identidad del 43.9% con *A. brasilense*. Se encontraron secuencias altamente conservadas que, en base a lo reportado por Pelanda *et al.* (1993), corresponden a los dominios para la glutamino amidotransferasa del tipo *purF*, un grupo de cisteínas involucradas en la formación del centro 3Fe-4S y el dominio de unión de FMN. En cuanto a la subunidad chica de *R. etli*, ésta presentó una similitud del 50.3% y una identidad del 30.3% con *E. coli* y una similitud del 49.8% y una identidad del 29.6% con *A. brasilense*, encontrándose también secuencias altamente conservadas que corresponden a dos grupos de cisteínas para la formación de los centros 4Fe-4S y un sitio de unión del NADPH.

De esta manera, la GOGAT de *R. etli* está compuesta de dos subunidades: la subunidad grande con un peso molecular de aproximadamente 172 kDa deducida a partir de su secuencia de nucleótidos y la subunidad chica de aproximadamente 50.5 kDa. Los genes que codifican para ambas subunidades se encuentran contiguos en el cromosoma probablemente formando un operón. Cabe mencionar que el tamaño de ambas subunidades corresponde al reportado para GOGAT's de otras bacterias, los cuales van desde 153 kDa hasta 175 kDa para la subunidad grande y de 50 kDa para la subunidad pequeña (Madonna *et al.*, 1985; Miller y Stadtman 1972; Trotta *et al.*, 1974).

Ha sido reportado que cepas deficientes en la actividad de la GOGAT presentan un fenotipo *Asm⁻*, es decir presentan auxotrofia por glutamato y además crecen pobremente en una variedad de aminoácidos como fuentes alternativas de nitrógeno (Nagatani *et al.*, 1971; Tyler, 1980; Kondorosi *et al.*, 1977; O'Gara *et al.*, 1984; Hilgert *et al.*, 1987). Cabe mencionar que esta

deficiencia para utilizar algunos aminoácidos ha sido directamente correlacionada con las mutantes en GOGAT. En el caso de *E. coli*, este fenómeno ha sido relacionado a la inducción de la respuesta Ntr, en donde se requiere necesariamente la inducción por los genes *ntr* (Reitzer, 1996) para que se lleve a cabo la utilización de algunos aminoácidos como prolina y arginina (Tyler, 1980). Sin embargo, en *Rhizobium meliloti* se ha reportado que este fenómeno no está directamente relacionado con la inducción de la respuesta *ntr* ya que la utilización de fuentes de nitrógeno como prolina, histidina, arginina o aspartato no dependen del producto de los genes *ntrA* y/o *ntrC* (Ronson *et al.*, 1987; Szeto *et al.*, 1987). Se sugiere la existencia de un sistema regulatorio adicional dependiente del genotipo *glt* y que ejerce control sobre el metabolismo nitrogenado (Lewis *et al.*, 1990).

En la mutante en GOGAT aquí reportada (TAD12), la utilización de diferentes aminoácidos como fuentes de nitrógeno se determinó por el crecimiento en MM líquido suplementado con cada uno de los aminoácidos mencionados, mientras que en los trabajos anteriormente citados (Kondorosi *et al.*, 1977; O'Gara *et al.*, 1984; Hilgert *et al.*, 1987) los ensayos fueron realizados en MM sólido. No obstante esta diferencia, en la mutante TAD12 podemos observar también que, al igual que en las otras cepas deficientes en GOGAT, la utilización de fuentes de nitrógeno que generan glutamato, como histidina, prolina, arginina, glutamina, es menos eficiente que la cepa silvestre. En este sentido, este fenómeno lo podemos relacionar si suponemos que la vía GS/GOGAT es importante no sólo en la asimilación de amonio, sino también para una regulación más general en la que el metabolismo nitrogenado y de carbono están íntimamente coordinados a través del ciclaje de la glutamina (Encarnación *et al.*, 1998; Mora, 1990).

Trabajos realizados en este laboratorio han demostrado mediante estudios con compuestos marcados con ^{14}C y ^{13}N que tanto en *R. etli* como en *R. meliloti* existe una relación coordinada entre la utilización y oxidación del carbono y la asimilación de nitrógeno. La glutamina se sintetiza y se degrada al mismo tiempo, constituyendo un ciclo (Encarnación *et al.*, 1998): la glutamina es convertida a través del ciclo en glutamato por la GOGAT y

también es catabolizada por la vía glutamina transaminasa- ω -amidasa cuyos productos (2-cetoglutarato y amonio) vuelven a ser sustrato para la vía GS/GOGAT (Fig. 22). El consumo de NADH, ATP y 2-cetoglutarato por la vía GS/GOGAT (Helling, 1994) regula la utilización/oxidación del carbono del succinato en *Rhizobium*. Ha sido demostrado que la optimización del flujo de energía requiere necesariamente el funcionamiento de reacciones que disipen la energía tales como al ciclo de la glutamina (Stucki, 1980; Tempest, 1978; Mora, 1990). Se propone que cuando este ciclo es interrumpido por la inhibición de la síntesis de la glutamina, se conduce a una gran reducción en la utilización/oxidación del succinato (Encarnación et al., 1998). Así, recientemente ha sido reportado que un aumento en la concentración de ATP inhibe la glicólisis (Larsson et al., 1997). El ciclaje de la glutamina vía GS/GOGAT junto con la degradación de glutamina regula el gasto de carbono dentro de la célula. Al volverse a sintetizar la glutamina a partir de su esqueleto de carbono y amonio se consume 2-cetoglutarato, energía y poder reductor, contribuyendo así a que se utilice y se oxide la fuente de carbono y no se acumule ATP y poder reductor. Al describir en ese trabajo la interacción entre los metabolismos de carbono y nitrógeno que ocurre en *Rhizobium* también se describe otro sistema regulador de la concentración intracelular del poder reductor y de la energía (vía GS/GOGAT) (Encarnación et al., 1998).

El hecho de que en *Rhizobium* la única vía de asimilación de amonio sea GS/GOGAT (Kondorosi et al., 1977; Donald y Ludwig, 1984; Hilgert et al., 1987; Bravo et al., 1988) nos ayuda a entender por qué cepas *Asm* que son defectivas en GOGAT son pleiotrópicas, esto es, incapaces de utilizar eficientemente diferentes aminoácidos como fuente de nitrógeno y/o de carbono.

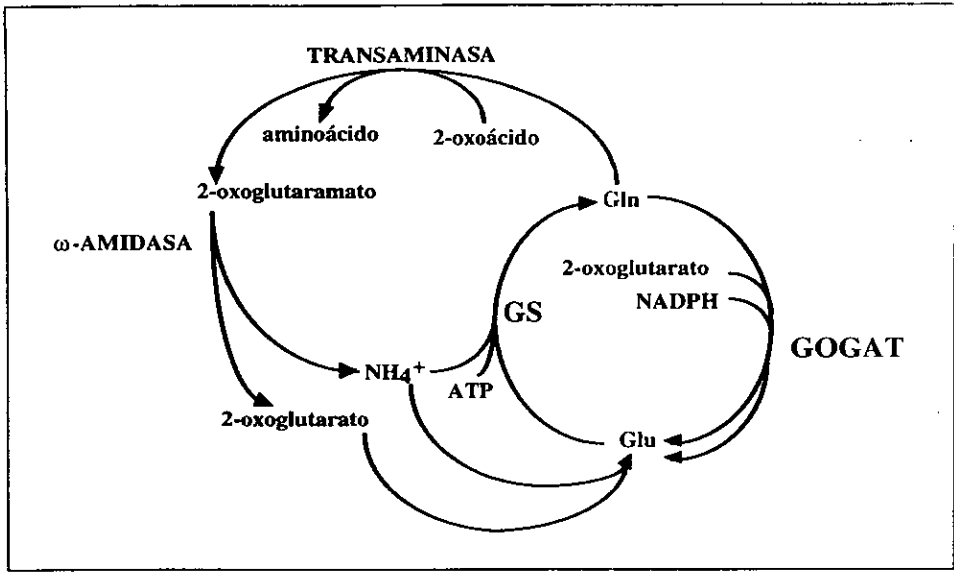


Figura 22. Ciclo de la Gutamina (Mora, 1990)

Uno de los ensayos que nos permitió conocer la distribución del nitrógeno amino de la mutante fue la medición de sus pozas de aminoácidos intracelulares en crecimientos de MM+Gln comparadas con la cepa silvestre. La mutante crecida en glutamina acumula una baja concentración de este aminoácido y en consecuencia también los demás aminoácidos están bajos, lo que significa que está disminuida su capacidad de utilizar el carbono de los aminoácidos, como resultado de que el ciclo de la glutamina no está operando a través de la vía GS/GOGAT. Cuando la cepa mutante está en fase estacionaria de crecimiento aumenta su capacidad de acumular nitrógeno amino, lo que se puede deber a que el succinato del medio se agotó y como consecuencia se transporta más glutamina del medio hacia dentro de la célula (Encarnación, et al., 1997).

Uno de los efectos más importantes estudiados en esta mutante ha sido su fenotipo simbiótico. Anteriormente se ha reportado que mutantes en GOGAT de *R. meliloti* no muestran un fenotipo simbiótico, es decir son

capaces de nodular y fijar nitrógeno cuando entran en simbiosis con sus plantas hospederas (Kondorosi *et al.*, 1977; Osburne y Singer, 1980). De esta manera, los estudios en los que se reportan los bajos niveles de las enzimas de asimilación de amonio en bacteroides (Brown y Dilworth, 1975), y en los que las mutantes en GOGAT (Kondorosi *et al.*, 1977; Osburne y Singer, 1980) son incapaces de asimilar amonio pero son completamente efectivas en simbiosis, soportan el punto de vista de que el sistema GS/GOGAT de la bacteria no es importante en el metabolismo del nitrógeno fijado como amonio. Sin embargo, cabe mencionar que en estos estudios sólo se caracteriza la capacidad de formar nódulos y la capacidad de fijar nitrógeno en un tiempo, es decir, no se sigue una cinética en simbiosis como la que se presenta en este trabajo, lo cual arrojó resultados muy interesantes.

Los resultados del fenotipo simbiótico de la mutante TAD12 son consistentes con los reportados en estudios previos de otros *Rhizobium*, en el sentido de que son capaces de nodular y fijar nitrógeno. En este trabajo se presentan estudios más detallados a través de seguir la cinética en simbiosis, en base a los cuales proponemos que el sistema GS/GOGAT del bacteroide es importante en la partición del nitrógeno fijado entre la planta y la bacteria.

Estudios previos realizados en el laboratorio en los que se ha explorado el rol del bacteroide en la asimilación de amonio durante la simbiosis han demostrado que al introducir el gen *gdhA* de *E. coli* bajo el control del promotor *nifHc* de *R. etli* (Valderrama *et al.*, 1996), éste se expresa óptimamente durante la fijación del nitrógeno lo que modifica la partición del nitrógeno dentro del bacteroide (Mendoza *et al.*, 1998). La GDH captura en el bacteroide la mayoría del nuevo amonio sintetizado en la poza de aminoácidos y en consecuencia tiene un impacto negativo en el nitrógeno que le da el bacteroide a la planta.

Durante la simbiosis se observa una disminución del nitrógeno amino en los bacteroides de la cepa mutante TAD12 comparada con la cepa silvestre, lo cual nos está indicando que la GOGAT participa en la asimilación del nitrógeno fijado; la concentración residual del nitrógeno amino que

encontramos en la mutante puede provenir de la degradación de la proteína de los bacteroides y/o de la planta.

La cantidad de nódulos que desarrolla una cepa deficiente en GOGAT es igual al de la cepa silvestre CE3 (Fig. 18), así como su forma y estructura (Figs. 19 y 20).

Los datos obtenidos de nuestros estudios en bacteroides sugieren que la actividad de GOGAT, reportada por Durán y Calderón (1995), que se encuentra presente en los bacteroides de *R. etli*, es necesaria para que se acumule nitrógeno amino en éstos. El nitrógeno amino total presente en bacteroides de una cepa que carece de la actividad de GOGAT (mutante TAD12) a los 18 dpi comparada con la cepa silvestre CE3, está disminuido seis veces aunque la concentración de nitrógeno amino presenta una disminución de sólo 2 veces esta se debe a que la cantidad de proteína disminuye tres veces. Así, la disminución específica del nitrógeno amino no se debe a que aumenta la proteína total de los bacteroides en la mutante carente de GOGAT. Esta disminución puede ser el resultado de una disminución en el número de bacteroides, debido a una limitación en su crecimiento antes de invadir los nódulos, por una disminución en su capacidad de asimilar el amonio que la planta le esta dando. Esto indica que la actividad de GOGAT de la bacteria y del bacteroide tiene un papel importante asimilando el amonio que le da la planta y parte del nitrógeno fijado por la nitrogenasa. A partir de los 25 dpi el nitrógeno amino total disminuye en los bacteroides de la cepa silvestre CE3 y aumenta la proteína, sin embargo, para la cepa mutante la disminución en la concentración del nitrógeno amino es debido a que disminuye el nitrógeno amino total y aumenta la proteína total de los bacteroides aunque todavía es dos veces menor que la cepa silvestre CE3 (Tablas 8 y 9). A los 39 dpi el nitrógeno amino por mg de proteína es similar en los bacteroides de ambas cepas debido a que la proteína total de los bacteroides de la cepa silvestre disminuye y sin embargo en la mutante aumenta (Tabla 8 y 9). Es posible que a los 39 dpi la GOGAT ya no participe en la asimilación del nitrógeno fijado y que el nitrógeno amino presente en los bacteroides provenga del nitrógeno

que le dió la planta o del que le provee la planta al iniciarse la senescencia de ésta.

El efecto descrito es el resultado de la ausencia de GOGAT, lo que da como resultado una disminución del nitrógeno amino y una menor cantidad de bacteroides en los primeros 18 días del establecimiento de la simbiosis, pero después se normaliza hasta alcanzar a la cepa silvestre a los 39 dpi.

Al inactivar la vía GS/GOGAT del bacteroide se incrementa la cantidad de nitrógeno en la planta. Esto parece indicar que cuando esta vía se encuentra funcional en el bacteroide, asimila parte del amonio producido por la fijación de nitrógeno y que cuando la GS-GOGAT no está activa, el amonio que era asimilado por el bacteroide se excreta a las células del nódulo. El incremento en la excreción de amonio de los bacteroides deficientes en la actividad de GOGAT hacia la planta, da como resultado un incremento tanto en la concentración de nitrógeno que es transformado en ureidos (Tabla 4), como en la concentración de nitrógeno presente en plantas (Tabla 5) que se refleja en un incremento en el contenido de nitrógeno en semillas (Tabla 6).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo nos han llevado a considerar que además de la biosíntesis de glutamato por la vía GS/GOGAT podría existir otra vía alternativa para la síntesis de este aminoácido, además de las vías ya conocidas, que se puede expresar bajo ciertas condiciones permitiendo que a falta de la GOGAT se siga sintetizando glutamato para el crecimiento de la bacteria y del bacteroide.

De esta manera, el trabajo presentado aquí, nos ayuda a entender un poco más acerca del metabolismo nitrogenado de bacterias que tienen la capacidad de establecer una relación simbiótica con plantas leguminosas, en este caso *R. etli*-frijol y el papel que la vía de asimilación GS/GOGAT de la bacteria tiene durante el proceso simbiótico. Sin embargo, cabe mencionar que estos resultados son sólo el inicio de un trabajo en vías de conocer y comprender más a fondo que es el metabolismo nitrogenado de *R. etli*, tanto en vida libre, como en simbiosis.

CONCLUSIONES

Los genes estructurales de la glutamato sintasa de *Rhizobium etli* fueron clonados y caracterizados, siendo éstos los primeros genes *gltBD* en rhizobáceas bien caracterizados incluyendo su secuencia.

Se caracterizó la cepa TAD12 la cual carece de la actividad de GOGAT y además presenta el siguiente fenotipo:

-No crece en amonio como fuente de nitrógeno, es auxotrofa de glutamato y es una cepa *Asm⁻*.

-Esta cepa es capaz de establecer una simbiosis con plantas de frijol, presentando un fenotipo simbiótico que consiste en que las plantas inoculadas con esta mutante presentan una mayor actividad de nitrogenasa, mayor transporte de nitrógeno por los vasos del xilema y una mayor concentración de nitrógeno tanto en planta como en semilla, lo cual nos sugiere que la actividad de GOGAT tiene una participación en la asimilación del nitrógeno fijado para el mismo bacteroide y la distribución del nitrógeno hacia la planta.

-Una propuesta que surge de este trabajo es que la actividad de GOGAT dentro del bacteroide juega un papel importante en la asimilación de amonio sólo en la parte inicial del proceso simbiótico.

-Por otro lado, no obstante a la falta de la GOGAT se propone la participación de otra vía alternativa para la síntesis de glutamato diferente de las hasta ahora conocidas.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFIA

- Adachi, K. y I. Suzuki. 1977. Purification and properties of glutamate synthase from *Thiobacillus thioparus*. J. Bacteriol. 129:1173-1182.
- Anderson, M.P., C.P. Vance, G.H. Haichel y S.S. Miller. 1989. Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. Plant Physiol. 90:351-359.
- Appleby, C.A. 1884. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:443-478.
- Awonaike, K.O., P.J. Lea, y B.J. Mifflin. 1981. The location of the enzymes of ammonia assimilation in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Sci. Lett. 23:189-195.
- Bachmann, B.J. 1972. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. Bacteriol. Rev. 36:525-557.
- Beloin C., S. Ayora, R. Exley, L. Hirschbein, N. Ogasawara, Y. Kasahara, J.C. y F.L. Hegarat. 1997. Characterization of an *lrp*-like (*lrpC*) gene from *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. 256:63-71.
- Berberich, M.A. 1972. A glutamate-dependent phenotype in *E. coli* K-12: the result of two mutations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47:1498-1503.
- Bohannon, D., M. S. Rosenkrantz y A. L. Sonenshein. 1985. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase genes by the nitrogen source. J. Bacteriol. 163:957-964.
- Boland, M.J., J.F. Hanks, P.H.S. Reynolds, D.G. Blevins, N.E. Tolbert, y K.R. Schubert. 1982. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. Planta 155:45-51.
- Boyer, H. W. y D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41:459-472.
- Bravo, A. y J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. J. Bacteriol. 170:980-984.
- Bravo, A., B. Becerril y J. Mora. 1988. Introduction of the *Escherichia coli* *gdhA* gene into *Rhizobium phaseoli*: effect on nitrogen fixation. J. Bacteriol. 170:985-988.
- Brenchley, J. E., M. J. Prival, y B. Magasanik. 1973. Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. J. Biol. Chem. 248:6122-6128.
- Brown, C.M. y M.J. Dilworth. 1975. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol. 86:39-48.
- de Bruijn, F. J., S. Rossbach, M. Schneider, P. Ratet, S. Messmer, W. Szeto, F. M. Ausubel y J. Schell. 1989. *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. J. Bacteriol. 171:1673-1682.

- Carlson, T. A., G. B. Martin y B. K. Chelm. 1987. Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 169:5861-5866.
- Castaño, I. 1990. Organización Estructural y Regulación del operón *gltBDF* de *Escherichia coli*. Tesis de Doctorado. CFIN, UNAM. 61 pp.
- Castaño, I., F. Bastarrachea y A. A. Covarrubias. 1988. *gltBDF* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170:821-827.
- Castaño, I., N. Flores, F. Valle, A.A. Covarrubias y F. Bolivar. 1992. *gltF*, a member of the *gltBDF* operon de *Escherichia coli*, is involved in nitrogen-regulated gene expression. Mol. Microbiol. 6:2733-2741.
- Calvo J.M. y R.G. Matthews. 1994. The leucine-responsive protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. Microbiol Rev. 58:466-490.
- Cogoni, C., L. Valenzuela, D. González-Halphen, H. Olivera, G. Mancino, P. Ballario y A. González. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high molecular weight polypeptide. L. Bacteriol. 1977:792-798.
- Cookson, C., H. Hughes y J. Coombs. 1980. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. Planta 148:338-345.
- Cullimore, J.V. y A.R. Sims. 1981. Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. Phytochemistry 20:557-600.
- Current Protocols in Molecular Biology. 1995. Eds. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman y K. Struhl. Jonh Wiley & Sons Inc.
- Chen, F. L. y J. V. Cullimore. 1989. Location of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Planta 179:441-447.
- Darrow, R. A. 1980. Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. En "Glutamine: metabolism, enzymology and regulation". Mora, J. and R. Palacios, eds. Academic Press. N. Y. pp. 139-166.
- Darrow, R. A. y R. R. Knotts. 1977. Two forms of glutamine synthetase in free-living root nodule bacteria. Biochem Biophys Res Commun. 78:554.
- Denarie, J. y P. Roche. 1992. *Rhizobium* nodulation signals. En : Molecular signals in Plant Microbe Communications. Ed. Desh Pal S. Verma. C. R. P. Press. USA. pp. 295-340.
- Deveroux, J., P. Haeberli y O. Smithies. 1984. A comprehensive set of analysis programs for the VAX. Nucl. Acids Res. 12:387-395.
- Ditta, G., S. Standfiel, D. Corbin y D. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351.
- Donald, R. G. y R. A. Ludwig. 1984. *Rhizobium* sp. strain ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. J. Bacteriol. 158:1144-1151.

- Durán, S. y J. Calderón. 1995. Rol of the glutamine transaminase- α -amidase pathway and glutaminase in glutamine degradation in *Rhizobium etli*. Microbiology 141:589-595.
- Durán, S., G. Du Pont, A. Huerta-Zepeda y J. Calderón. 1995. The rol of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant. Microbiol 141:2883-2889.
- Elmerich, C., W. Zimmer y C. Vieille. 1992. Associative Nitrogen-Fixing Bacteria. En: Biological Nitrogen Fixation. Eds. Stacey, G., H. Burris y H.J. Evans. Chapman & Hall. Nueva York. 221-222 pp.
- Encarnación, S., M. Dunn, K. Willms y J. Mora. 1995. fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. Bioch. Gen 34:453-465.
- Encarnación, S., J. Calderón, A.S. Gelbard, A.J. L. Cooper y J. Mora. 1998. Glutamine biosynthesis and the utilization of succinate and glutamine by *Rhizobium etli* and *Rhizobium meliloti*. Sujeto a publicación.
- Ernsting, B. R., M. R. Atkinson, A. J. Ninfa y R. G. Matthews. 1992. Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174:1109-1118.
- Ernsting, B. R., J. W. Denninger, R. M. Blumental y R. G. Matthews. 1993. Regulation of the *glhBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? J. Bacteriol. 175:7160-7169.
- Espín, G., S. Moreno, M. Wild, R. Meza y M. Iaccarino. 1990. A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glhT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. Mol. Gen. Genet. 223:513-516.
- Figurski, D. H. y D. R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:1648-1652.
- Filetici, P., M. P. Martegani, L. Valenzuela, A. González y P. Ballario. 1996. Glutamate synthase gene (*glt1*) sequence from *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the functional domains. Yeast 12:1359-1366.
- Friedberg D., J.V. Platko, B. Tyler y J.M. Calvo. 1995. The amino acid sequence of Lrp is highly conserved in four enteric microorganisms. J. Bacteriol. 177:1624-1626.
- Friedman, A. M., S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema y F. M. Ausubel. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use en the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. Gene 18:289-296.
- Garcíarrubio, A., E. Lozoya, A. Covarrubias y F. Bolívar. 1983. Structural organization of the genes that encode two glutamate synthase subunit of *Escherichia coli*. Gene 26: 165-170.
- Ginsburg, A. y E. R. Stadtman. 1973. Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. p. 9-44. En S. Prusiner and E. R. Stadtman (ed.), The Enzymes of Glutamine Metabolism. Academic Press, Inc., New York.
- Glynias, M.J. 1991. GeneWorks.IntelliGenetics, Inc.

- Greenwood, D. J. 1982. Nitrogen supply and crop yield: The global scene. *Plant Soil* 67:45-59.
- Gregerson R.G., S.S. Miller, S.N. Twary, J.S. Gantt, y C.P. Vance. 1993. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *The Plant Cell* 5:215-226.
- Grierson, D. y S. Covey. 1984. *Plant Molecular Biology*. Blackie, Chapman & Hall, Nueva York. 176 pp.
- Helling, R. B. 1990. The glutamate dehydrogenase structural gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 223:508-512.
- Helling, R. B. 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* 176:4664-4668.
- Hemmilä, I.A. y P. Mäntälä. 1978. Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* 173:45-52.
- Hilgert, U., J. Schell y F. J. de Bruijn. 1987. Isolation and characterization of Tn5-induced NADPH-glutamate synthase (GOGAT) mutants of *Azorhizobium sesbaniae* ORS571 and cloning of the corresponding *glt* locus. *Mol. Gen. Genet.* 210:195-202.
- Hummelt, G. y J. Mora. 1980. Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1688-1694.
- Jongsareejit, B., R. N. Rahman, S. Fujiwara y T. Imanaka. 1997. Gen cloning, sequencing and enzymatic properties of glutamate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1. *Mol. Gen. Genet.* 254:635-642.
- Kanamori, K., R. Weiss y J. D. Roberts. 1989. Ammonia assimilation pathways in nitrogen-fixing *Clostridium kluyverii* and *Clostridium butyricum*. *J. Bacteriol.* 17:2148-2154.
- Kennedy, C., R.R. Eady, E. Kondorosi y D. Klavans-Rekosh. 1976. The molybdenum-iron protein of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Journal* 155:183-188.
- King N.D. y M.R. O'Brian. 1997. Identification of the *lfp* gene in *Bradyrhizobium japonicum* and its role in regulation of δ -Aminolevulinic acid uptake. *J. Bacteriol.* 179:1828-1831.
- Kondorosi, A., Z. Svab, G.B. Kiss y R.A. Dixon. 1977. Ammonium assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 151:221-226.
- Larsson, Ch., A. Nilsson, A. Blomberg y L. Gustafsson. 1997. Glycolytic Flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon-or nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol* 179:7243-7250.
- Lea, P. J., S. A. Robinson y G. R. Stewart. 1990. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. En *The Biochemistry of Plants, Intermediary Nitrogen Metabolism*, Vol. 16, B. J. Mifflin and P. J. Lea, eds. San Diego: Academic Press. pp. 121-159.
- Lewis, T.A., R. Gonzalez, y J.L. Bostford. 1990. *Rhizobium meliloti* glutamate synthase: cloning and initial characterization of the *glt* locus. *J. Bacteriol.* 172:2413-2420.

- Lin, R., R. D'Ari, E. B. Newman. 1992. λ placMu insertions in genes of the leucine regulon: extension of the regulon to genes not regulated by leucine. *J. Bacteriol.* 174:1948-1955.
- Ludwig, R. A. 1980. Physiological roles of glutamine synthetase I and II in ammonium assimilation in *Rhizobium* sp. 32H1. *J. Bacteriol.* 141:1209-1216.
- Madonna, M. J., R. L. Fuchs y J. E. Brenchley. 1985. Fine structure analysis of *Salmonella typhimurium* glutamate synthase genes. *J. Bacteriol.* 161:353-360.
- Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 16:135-168.
- Magasanik, B. 1988. Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilizing genes. *Trends Biochem. Sci.* 13:475-479.
- Martínez, E., M. A. Pardo, R. Palacios y M. A. Cevallos. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1779-1786.
- Masters, D.S. y A. Meister. 1982. Inhibition by homocysteine sulfonamide of glutamate synthase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 257:8711-8715.
- McClure, P. R. e D. W. Israel . 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64:411-416.
- Meeks, J. C., C. P. Wolk, N. Schilling, P. W. Shaffer, Y. Avissar, y W. S. Chien. 1978. Initial organic products of Fixation of [¹³N]dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* 61:980-983.
- Mendoza, A., A. Leija, E. Martínez, G. Hernández y J. Mora. 1995. The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:584-592.
- Mendoza, A., B. Valderrama, A. Leija y J. Mora. 1998. NifA-dependent expression of glutamate dehydrogenase in *Rhizobium etli* modifies ammonium assimilation metabolism during symbiosis. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 11:83-90.
- Merrick, M. J. y R. A. Edwards. 1995. Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiol. Reviews.* 59:604-622.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, R.E. y E.R. Stadtman. 1972. Glutamate synthase from *Eschericia coli*. *J. Biol. Chem.* 247:7407-7419.
- Miller, R.W., D.G. Mcrae y K. Joy. 1991. Glutamate and γ -aminobutyrate metabolism in isolated *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol Plant-Microbe Interact* 4:37-45.
- Mora, J. 1990. Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* 54:293-304.

- Moreno, S., R. Meza, J. Guzmán, A. Carabez y G. Espín. 1991. The *glnA* gene of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli and its role in symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:619-622.
- Nagatani, H., M. Shimizu y R. C. Valentine. 1971. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen-fixing bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 79:164-175.
- Noel, K.D., A. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans y M.A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158:148-155.
- O'Gara, F., S. Manian y J. Meade. 1984. Isolation of an Asm^r mutant of *Rhizobium japonicum* defective in symbiotic N₂-fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* 24:241-245.
- Oliver, G., G. Gosset, R. Sanchez-Pescador, E. Lozoya, L. M. Ku, N. Flores, B. Becerril, F. Valle y F. Bolivar. 1987. Determination of the nucleotide sequence for the glutamate synthase structural genes of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 60:1-11.
- Osburne, M. S. y E. Signer. 1980. Ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 143:1234-1240.
- Pahel, G., A.D. Zelenetz y B.M. Tyler. 1978. *gltB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 133:139-148.
- Pate, J. S. y C. A. Atkins. 1983. Nitrogen uptake, transport, and utilization. En: *Nitrogen Fixation*, W. J. Broughton, ed. Oxford:Oxford Univ. Press. 3:245-298.
- Pelanda, R., M.A. Vanoni, M. Perego, L. Piubelli, A. Galizzi, B. Curti y G. Zanetti. 1993. Glutamate Synthase Genes of the Diazotrophic *Azospirillum brasilense*. *J. Biol. Chem.* 268:3099-3106.
- Prusiner, S., R. E. Miller y R. C. Valentine. 1972. Adenosine 3'5'-cyclic monophosphate control of the enzymes of glutamine metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2922-2926.
- Reibach, P. L., L. Mask Paul y G. Streeter. 1981. A rapid one-step method for isolation of bacteroids from root nodules of soybean plants, utilizing self-generating Percoll gradients. *Can. J. Microbiol.* 27:491-495.
- Reitzer, L. J. 1996. Ammonia assimilation and the Biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagina, L-alanina y D-alanina. p. 391-407. En: *En E. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.). Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Reitzer, L. J. y B. Magasanik. 1987. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. p. 302-320. En *E. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.). Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Rendina, A. R. y W. M. Orme-Johnson. 1978. Glutamate synthase: on the kinetic mechanism of the enzyme from *Escherichia coli* W. *Biochemistry* 17:5388-5393.

- Riba, L., B. Becerril, L. Servin-Gonzalez, F. Valle y F. Bolivar. 1988. Identification of a functional promotor for the *Escherichia coli* *gdhA* gene and its regulation. *Gene* 71:233-246.
- Robertson, J. G., K. J. F. Farnden, M. Warburton y J. M. Bonks. 1975. Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:265-272.
- Rocha, S. M. y N. A. de las Peñas. 1990. La fijación del nitrógeno. ICYT CONACyT, México. D. F. 12:78-82.
- Ronson, C. W., B. T. Nixon, L. M. Albright y F. M. Ausubel. 1987. *Rhizobium meliloti* *ntrA* (*rpoN*) gene is required for diverse metabolic functions. *J. Bacteriol.* 169:2424-2431.
- Sakakibara, H., M. Watanabe, T. Hase y T. Sugiyama. 1991. Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. *J. Biol. Chem.* 266:2028-2035.
- Salminen, S.O. y J.G. Streeter. 1987. Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* 169:495-499.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger, F., S. Nicklen y A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Schubert, K.R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:539-574.
- Segovia, L., P. W. Young y E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strain as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 43:374-377.
- Servin-González L. y F. Bastarrachea. 1984. Nitrogen regulation of synthesis of the high affinity methylammonium transport system of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 130:3071-3077.
- Shanmugam, K. T. y C. Morandi. 1976. Amino acids as repressors of nitrogenase biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)* 437:322-232.
- Shatters, R. G., Y. Liu y M. Kahn. 1993. Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 268:469-475.
- Shatters, R. G., J.E. Somerville y M.L. Kahn. 1989. Regulation of glutamine synthetase II activity in *Rhizobium meliloti* 104A14. *J. Bacteriol.* 171:5087-5094.
- Streeter, J. G. 1979. Allantoin and allantoinic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* 63:478-480.
- Stucki, J.W. 1980. The optimal efficiency and the economic degree of coupling of oxidative phosphorylation. *Eur J. Biochem.* 109:269-283.
- Suzuki, A. y P. Gadal. 1984. Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and in other organisms. *Physiologia Vegetale* 22:471-486.

- Szeto, W. W., N. T. Nixon, C. W. Ronson y F. Ausubel. 1987. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.* 169:1423-1432.
- Tempest, D. W. 1978. The biochemical significance of microbial growth yields: a reassessment. *Trends Biochem. Sci.* 3:180-184.
- Trotta, P.P., K.E.B. Platzer, R.H. Haschemeyer y A. Meister. 1974. Glutamine-binding subunit of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this glutamine amidotransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:4607-4611.
- Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47:1127-1162.
- Valderrama, B., A. Dávalos, L. Girard, E. Morett y J. Mora. 1996. Regulatory proteins and *cis*-acting elements involved in the transcriptional control of *Rhizobium etli* reiterated *nifH* genes. *J. Bacteriol.* 178:3119-3126.
- Vender, J. y H. V. Richeberg. 1964. Ammonium metabolism in a mutant of *Escherichia coli* lacking glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 90:218-220.
- Vogel, G. D. y van der Drift. 1970. Differential analysis of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33:143-157.
- Wakisaka, S., H-C. Sung, T. Aikawa, T. Tachiki y T. Tochikura. 1989. Glutamate formation by a new *in vitro* enzyme system consisting of purified glutamine synthetase and glutamate synthase. *J. Ferment. Bioeng.* 67:395-398.
- Wang, Q., M. Sacco, E. Ricca, C.T. Lago, M. DeFelice y J.M. Calvo. 1993. Organization of Lrp-binding sites upstream of *ilvH* in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 7:883-891.