

03062
lej. 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**Aislamiento y Caracterización de Mutantes
de *Asospirillum brasilense* que Afectan
Simultáneamente la Fijación de Nitrógeno
y la Utilización de L-Histidina**

TESIS
Que para obtener el Título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica
PRESENTA

Nora Lorena Alvarado Colle

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ABRIL DE 1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Indice

Introducción	1
El Nitrógeno	1
La Fijación de Nitrógeno	2
Ubicación Genérica de la Fijación de Nitrógeno	3
Regulación de la Transcripción de los Operones <i>nif</i>	5
Sistemas Ntr	6
Función y Regulación del Operón <i>glnALG</i> (<i>glnAntrBC</i>)	8
Efecto de la Metionina Sulfoximina sobre la Regulación Nitrogenada	11
Relación entre la Glutamino Sintetasa y la Fijación de Nitrógeno en <i>Rhizobium</i>	12
<i>Azospirillum brasilense</i> : un Modelo de Estudio Reciente	12
Objetivo del Proyecto de Tesis	15
Materiales y Métodos	18
Medios y condiciones de cultivo	18
Protocolo de mutagénesis con EMS	19
Mutagénesis con EMS en sólido	19
Protocolo de mutagénesis con el P1CmTn5Km	19
Determinación de la actividad de glutamino sintetasa (GS)	20
Determinación de la actividad de glutamato sintasa (GOGAT)	21
Determinación enzimática de histidasa	22
Cuantificación de proteínas	23
Purificación de glutamino sintetasa por el método de precipitación con polietilenglicol	23
Purificación de DNA cromosomal	24
Purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina	25
Electroclución de fragmentos de DNA	25
Hibridación	25
Resultados	28
Mutagénesis por etilmetanosulfonato (EMS) y selección para sensibilidad a metionina sulfoximina (MS)	28
Mutagénesis por EMS y selección para fenotipo Ntr ⁻	29
Mutagénesis por inserción de Tn5	29
Aislamiento de mutantes Hut ⁻ Nif ⁻ por mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG)	30
Aislamiento de mutantes MS ^S por inserción de Tn5	30
Crecimiento en sustratos Ntr	31
Sensibilidad de Mutantes a MS	31
Frecuencias de reversión	33
Determinaciones de GS de las mutantes	36
Niveles y condiciones de adenilación de mutantes Hut ⁻	36
Determinación de GS y grado de adenilación de mutantes MS ^S	38
Determinación de glutamato sintasa GOGAT de mutantes Hut ⁻ Nif ⁻	38
Presencia en <i>Azospirillum</i> de una sola GS	39
Determinación de histidasa de mutantes Hut ⁻	39
Aislamiento de mutantes revertantes para la fijación de nitrógeno en <i>A. brasilense</i>	40
Hibridación de DNA total de <i>A. brasilense</i> con Tn5 y pMC73A (<i>nifA</i>)	40
Hibridación con <i>ntrQ</i> de <i>E. coli</i>	44
Discusión	46
Bibliografía	53
Agradecimientos	60

Tablas y Figuras

Tabla 1. Cepas y Plásmidos Utilizados en este Trabajo.....	32
Tabla 2. Crecimiento de Mutantes Hut⁻Nif⁻ en Sustratos Ntr en Medio Sólido MM Suplemen- tado con	33
Tabla 3. Crecimiento de Mutantes MS^B en Sustratos Ntr en Sólido.....	34
Tabla 4. Actividad y Estados de Adenilación de Mutantes Hut⁻Nif⁻	37
Tabla 5. Actividad de GS y Adenilación de Mutantes MS^B.....	38
Tabla 6. Actividad de GOGAT de Mutantes Hut⁻Nif⁻.....	39
Figura 1. Organización del Acúmulo de Operones nif de K. pneumoniae. Función Génica y Regulación.....	4
Figura 2. Organización del Operón gln; Función Génica y Regulación	10
Figura 3. Sensibilidad de Mutantes a 50 µg/ml de MS	35
Figura 4. Hibridación de las Cepas MX2033, MX2102, MX2103 y MX2104 vs. P³² pBR322::Tn5	42
Figura 5. Hibridación de las Cepas MX2033, MX2102, MX2103 y MX2104 vs. P³² pMO73A y P³² pBR322::Tn5	43
Figura 6. Hibridación de las Cepas MX2103 y GM4 vs. P³² glnG de E. coli	45

Introducción

El Nitrógeno

El nitrógeno molecular es el elemento más abundante de nuestra atmósfera, constituye alrededor de un 80%. Sin embargo, en su forma reducida, éste es, como compuesto inorgánico u orgánico, disponible en el suelo para su utilización por las plantas y otros organismos, dicho elemento es escaso. En todos los organismos, desde los más simples hasta los más complejos en los que está presente la vida, el nitrógeno es constituyente fundamental de la misma. Forma parte de ácidos nucleicos, proteínas, aminoazúcares, aminolípidos, y es por así decirlo, la estructura orgánica alrededor de la cual se construye la arquitectura biológica.

Dentro de la gran diversidad biológica existen numerosas especies de microorganismos no relacionados filogenéticamente capaces de captar el nitrógeno molecular N_2 y utilizarlo como sustrato para la formación de sus biomoléculas nitrogenadas. A los organismos que poseen esta capacidad se les denomina diazotróficos. Un gran número de ellos además aportan el nitrógeno que han reducido a compuestos utilizables por otras especies, al habitat en el que se encuentran, ya sea enriqueciendo directamente al suelo, o bien asociándose con los organismos a los que benefician y aportándoles el nitrógeno reducido.

Existen primordialmente tres grupos de diazotrofos. El primero lo constituyen organismos que en vida libre y sin requerir de ninguna simbiosis fijan el N_2 , como son las algas verde-azules, actinomicetos, bacterias metanógenas y *Rhodospseudomonas capsulata*. El segundo grupo está formado por organismos de simbiosis facultativa, éste es, que pueden fijar N_2 tanto en vida libre como en asociación con alguna planta o insecto, i.e. el huésped a quien benefician. Encontramos aquí bacterias del género *Asospirillum* que se asocian a las raíces de algunas gramíneas, interaccionan con la raíz generando o propiciando un incremento en el número de deformaciones que sufre la raíz y en el número de pelos radiculares (Patriquin *et al.*, 1983). Es posible que exista un reconocimiento específico bacteria-raíz, y que la bacteria aporte una cierta cantidad de amonio a la planta a través de la raíz, fundamentalmente durante la etapa de floración de la planta (J. Okon, comunicación personal). Sin embargo, *Asospirillum* puede vivir y fijar N_2 en vida libre. Forman parte también de este segundo grupo, la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae* y otras como *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter croococum*.

Existe un tercer grupo, el de los diazotrofos de simbiosis estricta, en los cuales la facultad de fijar nitrógeno depende de la interacción del microorganismo con su huésped, y en la que se dan mecanismos de diferenciación tanto en la bacteria como en el huésped, indispensables para que dicha función pueda llevarse a cabo, i.e., estos microorganismos no fijan N_2 en vida libre. Ejemplo de esto son las bacterias del género *Rhizobium*. Estas infectan

las raíces de leguminosas mediante un reconocimiento específico mediado por ciertos azúcares complejos a nivel de la membrana celular de ambos organismos. Posteriormente se desencadena un programa de diferenciación en el que se forman los nódulos y en el cual la bacteria se transforma en bacteroide. La planta sintetiza ciertas proteínas en conjunción con la bacteria, como la leghemoglobina para cuya síntesis participan ambas, y es dentro de la estructura del nódulo que puede iniciarse la fijación de N_2 (Verma, 1983).

La capacidad para fijar N_2 esta distribuída a lo largo de una amplia gama de procariotes taxonómicamente divergentes, independientemente de si son Gram negativos o Gram positivos, como son *Enterobacteriaceae*, *Asotobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Cyanobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Rhodospirillaceae* y *Bacillaceae* (Ruvkun y Ausubel, 1980).

La reducción de nitrógeno molecular hasta amonio es un proceso enzimático complejo, el cual ha cobrado interés para su estudio en los últimos años pues representa una enorme aportación de amonio para la ecología en general y la agricultura en particular. Nada menos, la asociación entre leguminosas-*Rhizobium* aporta anualmente el 30% del total del nitrógeno molecular reducido hasta amonio (Hardy y Havelka, 1975). Se le ha comenzado a dar importancia a la identificación y estudio de especies fijadoras de N_2 en asociación con diversas plantas incluyendo la flora de bosques y selvas. Obviamente el interés se ha enfocado hacia interacciones de diazótrofos con plantas de consumo humano o animal. De los microorganismos de reciente descubrimiento se encuentra el genero *Asospirillum*, que de modo bastante específico se asocia a las raíces de algunas gramíneas como trigo, arroz y maíz (Baldani y Dobereiner, 1980), así como a pastos tropicales como avena y cebada (Klossak y Bohlool, 1983).

La Fijación de Nitrógeno *Klebsiella pneumoniae*, un modelo de estudio.

La reducción de N_2 hasta amonio y su regulación es un proceso que ha sido estudiado extensivamente en las últimas dos décadas. El modelo de estudio más conocido y manejado por muchos grupos de investigación es la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae*. En ella la información para dicho proceso está contenida en 17 genes contiguos agrupados en 7 u 8 operones nifQB AL F MVSU XNE YKDH J. De los 17 genes sólo 3 codifican para las proteínas estructurales de la nitrogenasa, en tanto que los demás codifican bien para genes regulatorios, bien para genes de maduración y procesamiento de la nitrogenasa y del cofactor de la misma, o para los acarreadores de electrones; a algunos de ellos aún no se les ha podido adjudicar una función inequívocamente. En la Figura 1 está esquematizada la estructura y función del bloque génico de fijación de N_2 (*nif*) (Eady *et al.*, 1972; McNeil *et al.*, 1978; Riedel *et al.*, 1979; Dixon *et al.*, 1981; Elmerich, 1984).

La nitrogenasa es un complejo enzimático constituido por dos componentes, una ferromolibdoproteína conocida como nitrogenasa, y una ferroproteína, nitrogenasa reductasa.

La nitrogenasa es un tetrámero formado por dos tipos de subunidades, alfa y beta, codificadas por *nifD* y *nifK* respectivamente. La nitrogenasa reductasa a su vez está codificada por *nifH* y se ensambla como un dímero de subunidades iguales. Su función es la de captar y unir Mg^{++} y ATP (Mortenson y Thorneley, 1979) y transferir los electrones que capta a la ferromolibdoproteína, en cuyo centro se unen los átomos de Mo, mediante la formación de un cofactor FeMoco. Este contiene Fe, S y Mo, y es indispensable para la actividad catalítica de la enzima (Shah y Brill, 1977).

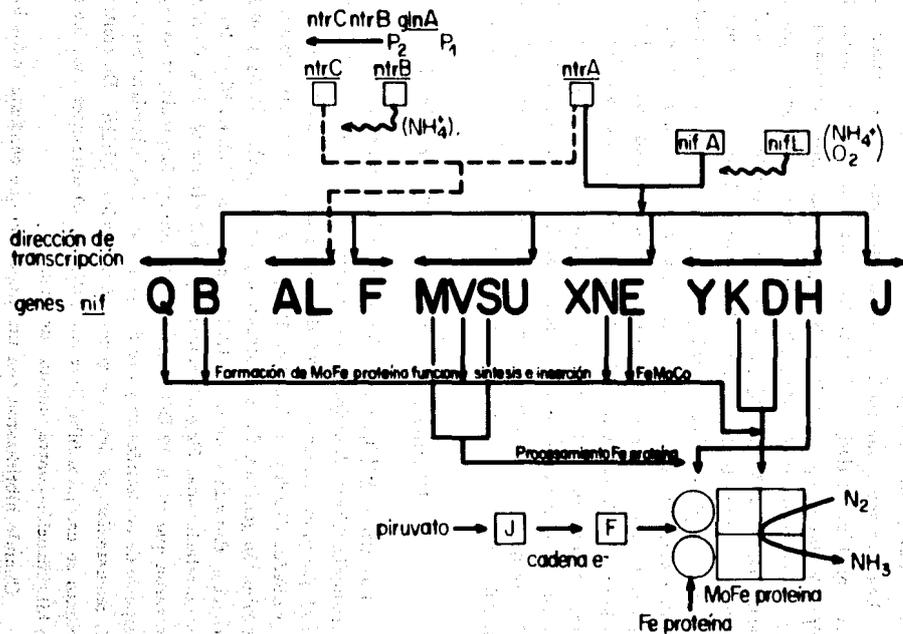
Los tres genes que codifican para estas proteínas se encuentran formando parte de un mismo operón, *nifHDK*. La formación de una ferromolibdoproteína funcional involucra la participación de cinco genes: *nifB*, *nifN*, *nifE* que están involucrados en la síntesis o la inserción del FeMoco (Roberts *et al.*, 1978), *nifY* que juega un papel en la especificidad por el sustrato (McLean y Dixon, 1981) y *nifQ* que se requiere en condiciones de deficiencia de Mo (Imperial *et al.*, 1984). Aparentemente tanto *nifM* como *nifS* se requieren para el procesamiento de la ferroproteína (Roberts *et al.*, 1978). *nifJ* y *nifF* han sido identificados como los componentes de transferencia de electrones a la nitrogenasa. El donador en la cadena de electrones es el piruvato, que es el sustrato de la proteína codificada por *nifI* (Shah *et al.*, 1983), a la que se le ha adjudicado la actividad de una flavodoxina oxidoreductora, que le transfiere los electrones a la proteína codificada por *nifF* (Nieva-Gomes *et al.*, 1980; Cannon *et al.*, 1985). Esta a su vez es sustrato de la ferroproteína. El operón *nifLA* codifica para los reguladores de la transcripción de los demás operones *nif* (Dixon *et al.*, 1977; Streicher *et al.*, 1974; Tubb, 1974). Aún no se ha encontrado ninguna función para *nifX*, *nifU* y *nifY* (ver Figura 1).

Ubicación Genérica de la Fijación de Nitrógeno

Los genes *nifHDK* que codifican para los polipéptidos del complejo nitrogenasa de *K. pneumoniae* fueron clonados en un fragmento de 6 Kpb de DNA (Cannon *et al.*, 1979), y se encontró que hibridizaban con DNA de todos y cada uno de los organismos fijadores de nitrógeno probados (Ruvkun y Ausubel, 1980; Masur *et al.*, 1980). En un intento por establecer la distribución genérica de la información para la fijación de N_2 y su grado de conservación interespecie, Ruvkun y Ausubel (1980) tomaron el DNA de 19 especies bacterianas fijadoras de N_2 no relacionadas filogenéticamente y mediante las técnicas de hibridización DNA-DNA encontraron que 19 de 19 DNAs aislados de diazótrofos, incluyendo especies Gram positivas, una especie de actinomicetos y dos de cyanobacterias, hibridizan contra el fragmento de DNA de *K. pneumoniae* que lleva los genes estructurales *nifHDK*. En contraste, cuando el mismo fragmento se usó para hibridizar con DNA de 10 diferentes especies no fijadoras de N_2 no hubo hibridización contra ninguna de ellas.

Cuando hibridizaron con un fragmento que contiene todos los genes *nif* menos los estructurales no obtuvieron resultados positivos, por lo que la homología interespecie parece estar limitada a estos últimos. Las secuencias más conservadas parecen ser las de *nifH* y *nifD* en

FIG. 1 ORGANIZACION DEL ACUMULO DE OPERONES *nif* DE *K. pneumoniae* FUNCION GENICA Y REGULACION. C. Elmerich 1984



las que se encuentra un alto grado de homología, en tanto que *nifK* no hibridiza de manera tan general. Además es interesante que al hibridizar un fragmento de DNA de *Rhizobium meliloti* que lleva *nifHDK* con los DNAs de las 19 cepas de diazótrofos, resultaron homólogos muchos de ellos pero no todos. *Azotobacter vinelandii* y *Rhodospseudomonas capsulata* no hibridizan contra DNA de *R. meliloti*.

Regulación de la Transcripción de los Operones *nif*

Se ha propuesto que el producto de *nifA* actúa como un activador positivo específico de todos los operones *nif* excepto el propio. Mutaciones en este gene tienen por consecuencia una ausencia total de los productos *nif* (Dixon *et al.*, 1977; Roberts *et al.*, 1978). Por análisis de complementación e introducción de plásmidos portadores de fusiones *nif::lac* en dobles mutantes, ha quedado sugerido que el producto de *nifA* puede actuar en trans (Dixon *et al.*, 1980).

Respecto al papel que juega el producto de *nifL*, las evidencias apuntan a que funge como un represor de la transcripción de los operones *nif*, como respuesta a un incremento en los niveles de O_2 fundamentalmente, ya que la nitrogenasa es muy sensible a la concentración de O_2 el cual la inactiva irreversiblemente. Hill *et al.*, (1981), han propuesto que el producto de *nifL* es un detector de O_2 . Asimismo, cuando la concentración de nitrógeno combinado se eleva intracelularmente de permisiva a no permisiva, el producto de *nifL* reprime la transcripción de los sistemas *nif* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1981; Merrick *et al.*, 1982; Elmerich, 1984). El grupo de San Chiun Shen (1985), ha propuesto que de hecho, el producto de *nifL* actúa directamente sobre el producto de *nifA* para reprimir la transcripción, y no a nivel de las secuencias de control en el DNA.

En *Klebsiella pneumoniae* hay tres parámetros fundamentales por los que se regula la fijación de N_2 :

- i) La presencia de cualquier fuente nitrogenada en el medio o dentro de la célula, particularmente NH_4^+ reprime totalmente la síntesis de los genes *nif* (Tubb y Postgate, 1973)
- ii) La tensión parcial de O_2 , ya que la nitrogenasa se inactiva irreversiblemente por la presencia de O_2 y la síntesis de novo de los productos *nif* no ocurre cuando éste está presente (St. John *et al.*, 1974; Eady *et al.*, 1978; Elmerich, 1984). La presión parcial de O_2 que resiste la nitrogenasa de diferentes organismos varía dentro del rango de 0.1 a 0.5%. Asimismo, la estrategia de protección de la nitrogenasa varía según el microorganismo; en el caso de *Rhizobium*, durante la interacción y diferenciación planta-bacteria, una vez establecido el nódulo funcional, se sintetiza una proteína, la leghemoglobina, que precisamente cumple la función de captar y dosificar el O_2 que entra en contacto con la nitrogenasa
- iii) La temperatura: a $37^\circ C$, no hay síntesis de novo de nitrogenasa, si bien a esta temperatura la nitrogenasa si es activa (Hennecke y Shanmugam, 1979). La temperatura óptima es de $30^\circ C$, por arriba de la cual no se sintetizan los productos de los genes *nif*.

Utilizando plásmidos que en forma constitutiva expresan *nifA*, (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1981; Zhu y Brill, 1981) han confirmado que el producto de *nifA* es termosensible, y dado esto, se explica el porqué a 37°C la transcripción a partir de los otros operones *nif* no pueda ser activada. Por otro lado, se ha observado que en ausencia del producto de *nifL*, la expresión de *nifA* es suficiente para activar la expresión de los genes *nif* aún en presencia de NH_4^+ o de O_2 , con lo que queda fuertemente sugerido que el producto de *nifL* es en efecto el represor que responde tanto a O_2 como a la fuente de nitrógeno compuesto. Del mismo modo, cuando la síntesis de *nifA* ocurre a partir de un promotor constitutivo, el exceso del producto de *nifA* sobrepasa y anula la represión mediada por *nifL* sobre los genes *nif*. Se ha observado que cuando se tiene el gene de *nifH* clonado en un vector multicopia, la concentración del promotor de *nifH* titula el producto de *nifA*, observable por el hecho de que se inhibe la desrepresión de los genes *nif* (Brown y Ausubel, 1984).

Como ya se mencionó, *nifA* no activa su propia síntesis (Dixon *et al.*, 1980), a excepción hecha de cuando se encuentra expresándose a partir de un promotor constitutivo. (Ow y Ausubel, 1983). En condiciones fisiológicas la transcripción de *nifA* está sujeta a un segundo nivel de regulación controlada por los productos de *ntrC* y *ntrA* que interaccionan para activar dicha transcripción.

Sistemas Ntr

Dentro de la célula existen numerosos sistemas genéticos involucrados en el aprovechamiento del nitrógeno en sus diferentes formas. Estos sistemas, regulados a su vez por un sistema general de detección del nitrógeno, se han llamado "Sistemas Ntr". Como ejemplo de ellos se pueden mencionar los operones para el catabolismo de algunos aminoácidos como histidina, arginina y prolina, los genes involucrados en el transporte de estos aminoácidos, el operón que codifica para la glutamino sintetasa (GS), y posiblemente los genes para la utilización de nitratos y nitritos (Tyler, 1978).

Los genes que regulan los sistemas Ntr se denominan *glnG* y *glnF* en *Escherichia coli*, o *ntrC* y *ntrA* respectivamente en *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Salmonella* y otros microorganismos. *ntrC* codifica para una proteína bifuncional que puede fungir como activador y como represor. *ntrC* requiere de la proteína de *ntrA* para actuar como activadores de la transcripción, como respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en la célula.

Por otra parte, *ntrC* sólo funciona como represor a nivel del operón del cual forma parte, *glnAntrBC*. Para ello se postula que interactúa con el producto de *ntrB* (*glnL*) (Alvarez-Morales *et al.*, 1984). Aparentemente *ntrB* es un detector de amonio, por lo que cuando éste aumenta intracelularmente, *ntrB* promueve la unión de *ntrC* al promotor P2 de este operón para reprimir (Alvarez-Morales *et al.*, 1984; Hawkes *et al.*, 1985). El modo preciso en que participa *ntrB* no está claro aún, ya que mutaciones en este locus presentan fenotipos muy variados. *ntrC* forma parte del operón *glnA* que codifica para la GS, y en este operón la

transcripción corre de glnA a ntrC, por lo que algunas mutantes en glnA o en ntrB son polares para ntrC, y por lo tanto no pueden crecer utilizando algunos aminoácidos como única fuente de nitrógeno, y presentan fenotipo Ntr^- (Magasanik, 1982).

La regulación de los sistemas Ntr por los productos de ntrC y ntrA ha sido descrita en *E. coli* (Pahel y Tyler, 1979; Backman et al., 1981; Pahel et al., 1982; McNeil et al., 1982), *S. typhimurium* (Brenchley et al., 1975; Tyler, 1978; Kustu et al., 1979), *K. aerogenes* (Bender y Magasanik, 1977), *K. pneumoniae* (Ausubel et al., 1979; Espín et al., 1982).

En *K. pneumoniae* se han localizado las regiones de control del operón glnAntrBC y se sabe que hay dos promotores a partir de los cuales se transcribe en el orden P1P2glnAP3ntrBC. La transcripción se lleva a cabo a partir de P1 en condiciones de limitación de nitrógeno y a partir de P2 en exceso de nitrógeno. Así, en condiciones de limitación de N la biosíntesis de la glutamino sintetasa está desreprimida; del mismo modo los operones que están bajo el control Ntr lo están. Por otra parte, como ya quedó mencionado, es a nivel del P2 que el producto de ntrC se une para reprimir la transcripción (Dixon et al., 1984; Alvarez-Morales et al., 1984).

En *Escherichia coli*, además de estos dos promotores se ha identificado un tercer promotor (promotor lejano) PL, ubicado en la región anterior "up-stream" al P1 de glnA. Aparentemente éste responde a otro tipo de regulación, posiblemente por la fuente de carbono. Este es un promotor débil, y se ha encontrado que en mutantes en glnG (ver mas adelante), la transcripción de glnA ocurre a partir de PL. En mutantes en glnF no hay transcripción de glnA porque el producto de glnG si bien no activa este promotor PL, sí lo reprime (ver más adelante). Esquemáticamente es P2P1glnAPLglnLG (Covarrubias et al., 1983).

En *K. pneumoniae* la fijación de nitrógeno está regulada de un modo general por los productos de ntrC y ntrA, por lo que esta función también es un sistema Ntr . ntrC y ntrA activan exclusivamente la transcripción del operón de los genes reguladores de la nitrogenasa nifLA (McNeil y Brill, 1980; Buchanan-Wollaston et al., 1981). A su vez nifA requiere de la presencia de ntrA para activar los demas operones nif (Dixon et al., 1984). En ausencia de ntrA, aún teniendo síntesis de nifA a partir de un promotor constitutivo, éste no es capaz de activar la transcripción de los genes nif. Asimismo, ya se mencionó que ntrC requiere de la presencia de ntrA para poder funcionar como activador, por lo que el producto de ntrA es indispensable tanto para ntrC como para nifA (Leonard y Goldberg, 1980; Espín et al., 1982; de Bruijn y Ausubel, 1983; Drummond et al., 1983; Merrick, 1983).

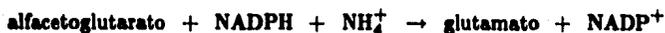
Se han encontrado marcadas semejanzas entre los operones ntrBC y nifLA. Cuando se sobreproduce nifA a partir de un vector multicopia, éste es capaz de sustituir a ntrC en sus funciones de activador de promotores Ntr , incluyendo su propio promotor, el operón de utilización de histidina, arginina, prolina, el operón glnAntrBC, éste último en un fondo genético ntrC::Tn6, en el que las actividades de GS se restablecen a normalidad (Ow y Ausubel, 1983a; Drummond et al., 1983). En cambio, la proteína codificada por ntrC no puede sustituir al producto de nifA como activador de los promotores nif, excepto nifH de *Rhizobium meliloti*, que clonado e introducido a *Escherichia coli* puede ser activado por ntrC y ntrA, también en

Klebsiella pneumoniae puede activarse por nrC y nrA (Sundaresan *et al.*, 1983). Sin embargo, nifH de *Klebsiella pneumoniae* sólo puede ser activado por nifA y no por nrC.

Por otra parte, los pesos moleculares de las proteínas de nrC y nifA son muy semejantes. Ambas pesan alrededor de 55,000 daltones (Chen y Magasanik, 1982). Ambos operones, nrBC y nifLA codifican para productos involucrados en represión y activación en un arreglo físico semejante. Tanto nrB como nifL median la represión por amonio. Estos datos han llevado a plantear que nrC y nifA tienen un origen evolutivo común, posiblemente una duplicación, con una posterior especialización (Ow y Ausubel, 1983b).

Función y Regulación del Operón glnALG (glnAntrBC)

En enterobacterias del tipo de *E. coli*, *K. aerogenes*, *S. typhimurium* y *K. pneumoniae*, existen tres vías metabólicas principales para la asimilación de NH_4^+ . En condiciones de exceso de NH_4^+ , éste se asimila por medio de la enzima deshidrogenasa glutámica (GDH), que cataliza la siguiente reacción:



Cuando la fuente de N es limitante, el amonio se asimila mediante la participación de dos enzimas, la glutamino sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) que catalizan las reacciones 1 y 2 respectivamente:

1. $\text{L-glutamato} + \text{NH}_4^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{L-glutamina} + \text{ADP} + \text{Pi}$
2. $\text{L-glutamina} + \text{alfacetoglutarato} + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{L-glutamato} + \text{NADP}^+$

Así, en condiciones de exceso de N, la glutamino sintetasa se encuentra reprimida tanto a nivel de su actividad como a nivel de su síntesis, en tanto que cuando la fuente de N es limitante sucede lo contrario, la GS se desreprime, hay mucha y muy activa.

La glutamino sintetasa es una enzima compuesta por doce subunidades idénticas. El peso global es de 600,000 daltones, por lo que cada subunidad pesa aproximadamente 50,000 daltones $\pm 5,000$ daltones (varía según el microorganismo). Cuando se comparan las GS's de las diferentes bacterias arriba mencionadas, se encuentra que sus pesos moleculares son muy semejantes, así como su función y modo de regulación, lo que sugiere que está muy conservada evolutivamente (Magasanik, 1982). La glutamino sintetasa es una enzima clave del metabolismo celular pues es la única vía para la síntesis de glutamina y ésta a su vez es donadora prácticamente universal de grupos amino dentro de la célula, así como sustrato clave de muchas vías de síntesis.

Dada su importancia la GS está sujeta a dos niveles de regulación; de la actividad y de la síntesis. A nivel de su síntesis, glnA el gene estructural para la GS, está regulado como un

sistema Ntr en el que participan *ntrC* y *ntrA* como activadores, y *ntrC* y *ntrB* como represores de la transcripción. A nivel de su actividad, cada subunidad puede modificarse independientemente mediante la adición de una molécula de AMP que se une a una tirosina expuesta en cada una de las subunidades, con lo cual cada una queda inactivada. Gradualmente podemos encontrar a la GS totalmente adenilada e inactiva. En condiciones de exceso de N es cuando más adenilada encontramos a la GS, que puede llegar a estar totalmente adenilada ($\bar{n}=10-12$).

Participan en esta regulación tres proteínas, la Adenililtransferasa (ATasa) codificada por *glnE*, la Uridililtransferasa (UTasa) codificada por *glnD* y la proteína PII codificada por *glnB*. PII está encargada de mediar la adenilación de cada subunidad de la GS como una respuesta en cadena que involucra a la UTasa, que a su vez detecta los cambios en la relación intracelular de glutamina/alfa-cetoglutarato. Aún cuando la adenilación y desadenilación pueden ser catalizadas por la ATasa sólo, la tasa de ambas reacciones, particularmente la de desadenilación, es estimulada por PII. En su forma no modificada PII estimula la adenilación, y en su forma uridilada, PII UMP estimula la desadenilación. La interconversión de PII en PII UMP depende de una proteína que aparece tanto como una uridililtransferasa, que cataliza la conversión de PII en PII UMP utilizando UMP, como la de una enzima removeadora de uridilos que convierte PII UMP en PII. La actividad de la UTasa es estimulada por alfa-cetoglutarato e inhibida por glutamina. De este modo, hay evidencias que sugieren que una tasa baja de glutamina con relación al alfa-cetoglutarato estimulan la conversión de PII en PII UMP, con lo que la glutamino sintetasa se desadenila (Ginsburg y Stadtman, 1973).

Cuando hay mutaciones en *glnD*, al no haber UTasa, la PII se encuentra en su estado no uridilado, por lo que la glutamino sintetasa que encontramos en estas condiciones está altamente adenilada y por lo tanto inactiva bajo cualquier condición de cultivo. Además las mutantes en *glnD* presentan simultáneamente un fenotipo Ntr^- , como consecuencia aparentemente de un efecto pleiotrópico sobre la transcripción de *glnG* (*ntrC*), quizá porque PII, en su forma desuridilada se mantiene como un co-represor de *glnL* (*ntrB*) para impedir que el producto de *glnG* (*ntrC*) sea transcrito o pueda transformarse en un activador efectivo (Foor et al., 1978; 1980; Ow y Ausubel, 1983b). En consistencia con este modelo, una fusión *nifL-lacZ* es incapaz de sintetizar beta-galactosidasa en una cepa *glnD* (Ow y Ausubel, 1983b).

Por otro lado, mutantes que carecen de la proteína PII (*glnB*), presentan un fenotipo Gln^C (constitutividad de la GS), y regulación normal de Ntr, esto siempre y cuando la mutación provoque una ausencia total de PII. Este fenotipo se explica al considerar que cuando hay una ausencia de PII, la GS estará presente en su forma desadenilada, condición que por el mismo razonamiento anterior, tendrá un efecto de inducción de la síntesis de *glnG* (*ntrC*), presente ahora en cantidad suficiente para activar la transcripción de los sistemas Ntr. En cambio, cuando las mutaciones generan una proteína PII defectuosa incapaz de ser uridilada, el fenotipo que presentan es muy similar a una *glnD*, son Ntr^- , y la GS está totalmente adenilada (Magasanik, 1982) (ver Figura 2).

En cuanto a los fenotipos causados por mutantes en los locus regulatorios *ntrC* (*glnG*)

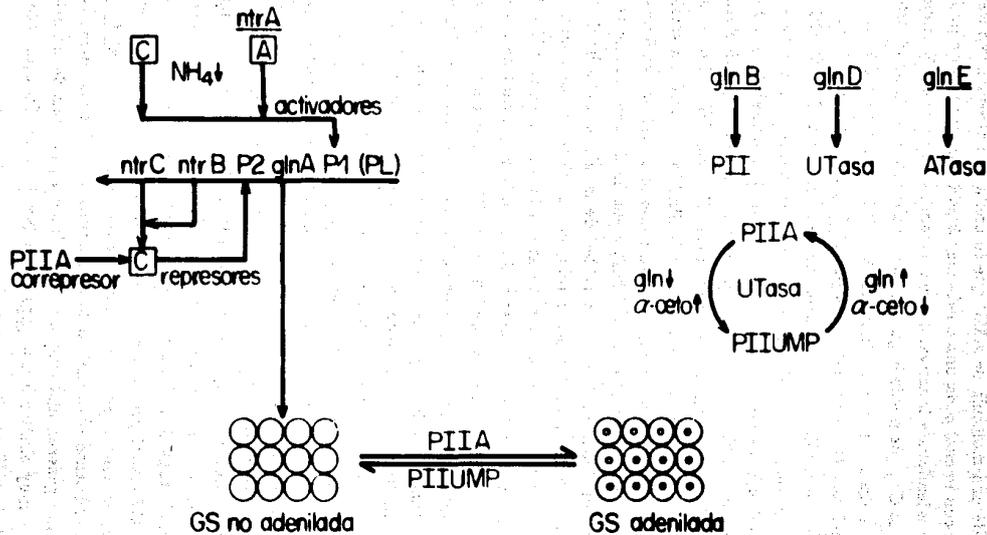


FIG. 2 ORGANIZACION DEL OPERON *gln*, FUNCION GENICA Y REGULACION.

y *ntrA* (*glnF*) se ha observado lo siguiente: mutantes en *glnA* son auxótrofos de glutamina. Estas mutantes pueden ser polares sobre *ntrC* (*glnG*), en cuyo caso son también *Ntr*⁻. Por otra parte, mutaciones en *ntrC* (*glnG*) presentan un fenotipo característico. Son protótrofos, aunque los niveles de GS que presentan son bajos constitutivos, es decir, que no son capaces de inducir la síntesis de la GS en condiciones de limitación. En estas mutantes la transcripción de *glnA* se realiza a partir del PL (promotor lejano), lo cual promueve una tasa de síntesis del transcrito *glnA* suficiente apenas para el crecimiento. Sin embargo, al no haber transcrito de *ntrC* (*glnG*) las células no pueden crecer en fuentes alternativas de N y por lo tanto presentan fenotipo *Ntr*⁻. Asimismo, estas mutantes resultan hipersensibles a la inhibición de crecimiento causada por la metionina sulfoximina (MS) (ver más adelante).

El gene *ntrA* (*glnF*) está localizado en el cromosoma bacteriano a 18 min del operón *glnALG*, cerca del min 69. Aparentemente la síntesis de *ntrA* no está sujeta a ningún tipo de regulación mediada por N, sino que se da de un modo constitutivo (Castaño y Bastarrachea, 1984; Merrick et al., 1985). Mutaciones en este locus causan auxotrofia por glutamina, asimismo presentan fenotipo *Ntr*⁻. En *E. coli* éstas reversiones a muy alta frecuencia, 1×10^{-4} , a prototrofia. Se han mapeado estas revertantes y se ha encontrado que son producto de mutaciones supresoras en *ntrC* (*glnG*), con lo que siguen siendo *Ntr*⁻.

Efecto de la Metionina Sulfoximina sobre la Regulación Nitrogenada

Está reportado que la metionina sulfoximina (MS), que es un análogo del ácido glutámico, se pega a la glutamino sintetasa y la inactiva irreversiblemente (Ronsio et al., 1969). Por otra parte, Miller et al., (1981), hacen referencia a que la presencia de MS favorece la adenilación de la GS. Asimismo, se ha observado un efecto pleiotrópico de la MS sobre mutantes en *glnG* (*ntrC*). Dichas mutantes aparecen fenotípicamente hipersensibles a la inhibición de crecimiento causada por este compuesto, de tal modo que la concentración de MS a la que todavía pueden crecer es mucho menor que la que resiste la cepa silvestre.

Basándose en este hallazgo, Osorio et al. (1984) aislaron mutantes resistentes a MS. Estas son supresoras de mutantes en *glnG* (*ntrC*), que mapean en el promotor lejano P1 de *glnA* (León et al., 1985). Este promotor, como ya se mencionó anteriormente, es un promotor débil cuya secuencia corresponde al consenso en *E. coli*, y a partir del cual se transcribe *glnA* en mutantes *glnG*⁻, con lo que dicho transcrito es apenas suficiente para que la cepa sea protótrofa. En las mutantes resistentes a MS dicho promotor se transcribe constitutivamente, con lo que la cantidad de GS es suficiente para titular la MS y sobreponerse a su efecto.

Por otra parte, Gordon y Brill, (1974) trabajando con *K. pneumoniae* y *A. vinelandii*, y Stewart y Rowell (1975) con *Anabaena cylindrica*, todos microorganismos diazotróficos, han observado un efecto interesante que causa la presencia de la MS sobre la fijación de nitrógeno, y éste es, que aún en presencia de NH_4^+ y de MS, dichos organismos son capaces de desreprimir la síntesis de nitrogenasa hasta en un 50%, e incluso exportar amonio al medio extracelular.

Relación entre la Glutamino Sintetasa y la Fijación de Nitrógeno en *Rhizobium*

En *Rhizobium japonicum* 61A76 así como en algunas cepas de *Rhizobium trifolii* de crecimiento rápido, *Rhizobium sp.*, se ha demostrado la existencia de dos glutamino sintetasas GSI y GSII (Darrow y Knotts, 1977; Ludwig, 1980). La GSI se regula por un sistema de adenilación-desadenilación semejante al de enterobacterias. En cambio la GSII no está sujeta a este tipo de regulación (Darrow, 1980). Se ha observado que en mutantes de *Rhizobium sp.* 32H1, en las que las dos GS's están alteradas o bien, cuando solamente la GSI está alterada y presenta niveles de adenilación muy elevados, dichas mutantes presentan fenotipo Nif^- . En cambio mutaciones en la GSII no modifican su comportamiento respecto a la fijación de nitrógeno y la nodulación y siguen siendo Nif^+ . Asimismo, las revertantes en adenilación de la GSI recuperan la capacidad para reducir el N_2 (Ludwig, 1980; Morett, 1984).

Azospirillum brasilense: un Modelo de Estudio Reciente

Azospirillum brasilense es un microorganismo diazotrófico perteneciente al género *Azospirillum*. Son bacterias Gram negativas que se han encontrado asociadas a una gran variedad de pastos incluyendo trigo, arroz, maíz y sorgo (Kumari et al., 1976). Hasta el momento se han clasificado tres especies, *Azospirillum brasilense* asociada fundamentalmente a trigo y arroz, *Azospirillum lipoferum* asociada a maíz (Tarrand et al., 1978; Baldani y Dobereiner., 1980) y *Azospirillum amazonense* (Magalhaes et al., 1983).

Aparentemente las dos primeras se distinguen entre otras características por su especificidad respecto a plantas C4 y C3, siendo *A. lipoferum* específica de sistemas C4 y *A. brasilense* de C3 (Baldani y Dobereiner., 1980). Se ha reportado también que bacterias del género *Azospirillum* excretan auxinas, giberelinas, ácido indolacético y sustancias del tipo de citocininas (Tien et al., 1979) a las que se les ha adjudicado el incremento en raíces laterales y la proliferación de pelos radiculares observados en plantas inoculadas con *Azospirillum* (Umali-García et al., 1980). Si bien no se han observado estructuras del tipo del nódulo presente en la asociación *Rhizobium-leguminosa*, entre *Azospirillum-gramínea*, sí se ha encontrado especificidad en la asociación y penetración específica de la raíz (M. Zamudio, comunicación personal). Dado el potencial biológico que tiene este microorganismo, se le ha comensado a estudiar exhaustivamente.

El grupo de C. Elmerich ha realizado numerosos estudios genéticos en relación al metabolismo nitrogenado de *Azospirillum*. Quiviger et al., (1982), han detectado en *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum* la existencia de una región de DNA con homología a los genes estructurales de la nitrogenasa *nifHDK* de *K. pneumoniae*. Por hibridación DNA-DNA detectaron un fragmento de 6.7 Kb homólogo a *nifHDK*, que llamaron ABRI. Este fragmento fue clonado en *E. coli* utilizando el bacteriófago λ gt7 - *ara8*, en el que se construyó un banco de genes de *A. brasilense*.

También se encontró homología entre *A. brasilense* y *K. pneumoniae* cuando se hibridó contra el DNA de *nifA* (Nair *et al.*, 1983). Jara *et al.*, (1983), en un intento por aislar mutantes Nif^- alteradas en los genes estructurales de nitrogenasa, obtuvieron tres cepas que no presentaron actividad de nitrogenasa ni cuando se encontraban en condiciones de desrepresión. Como previamente había sido reportado que plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP pueden ser introducidos en *Azospirillum* y que se mantienen estables, Polsinelli *et al.*, (1980), decidieron clonar el fragmento ABRI (*nifHDK*) en el sitio único *EcoRI* del plásmido RK290. Este plásmido (Ditta *et al.*, 1980), confiere resistencia a tetraciclina y contiene sitios únicos para algunas enzimas de restricción. Como este plásmido no es autotransferible, se requirió del plásmido pRK2013, que es transferencia⁺, como ayudador. La frecuencia de conjugación para *A. brasilense* encontrada con el pRK290 fué del orden de 3×10^{-4} .

Se construyeron dos plásmidos, el pAB35 (*nifHDK*) y el pAB36 (*nifH* y una delección de 2.6 Kb que comprende el gene de *nifK* y un fragmento de *nifD*). Estos dos plásmidos fueron usados en experimentos de complementación de las mutantes Nif^- . De éstas, sólo una fue complementada hasta en un 30% de las actividades silvestres con el pAB35. El pAB36 no la complementa, por lo que dicha mutante puede estar en alguno de los dos genes deletados del pAB36, o bien llevar una delección en *nifH* polar sobre la transcripción. Las otras dos mutantes analizadas no fueron complementadas. Cuando el pAB35 se introdujo a células de la cepa silvestre, la actividad de nitrogenasa se redujo hasta un 50%. Esto está en concordancia con lo encontrado para *K. pneumoniae* en el sentido de que la presencia de *nifH* en un vector multicopia titula el activador *nifA* y la resultante es una disminución de nitrogenasa (Dixon *et al.*, 1984).

En organismos como *K. pneumoniae* se ha observado una correlación entre mutaciones en el gene estructural para la enzima glutamato sintasa, *gltB*, una incapacidad para desreprimir los niveles de la GS y un fenotipo Ntr^- que en algunos organismos diasotróficos incluye la fijación de N_2 . Se ha propuesto que el efecto pleiotrópico observado en estas mutantes sobre el fenotipo Ntr , se debe a que cepas deficientes en glutamato sintasa (GOGAT) acumulan glutamina, lo que a su vez causa la adenilación e inactivación de la GS (Nagatani *et al.*, 1971; Brill, 1975).

Como ya se mencionó anteriormente respecto a mutantes en *glnD*, cuyas GS's están altamente adeniladas por falta de la enzima modificadora de la PII, ésto genera que la síntesis tanto del producto de *glnA* como del producto de *glnG* (*ntrC*) se detenga, lo que a su vez tiene por consecuencia una incapacidad para activar los sistemas Ntr . Esto ha sido sugerido por Tubb (1974) y por Streicher *et al.*, (1974) para mutaciones en *gltB*.

Asimismo, Foor y Magasanik, (1980) han propuesto que el producto de *glnB*, PII, que en su forma desuridilada es el que favorece la adenilación de la GS, estado en que se encuentra cuando se eleva la concentración intracelular de la glutamina, pudiera actuar como un co-represor de la síntesis de *ntrC* (*glnG*) o directamente de su transformación en activador, con lo cual al no haber suficiente producto de *ntrC* se presenta el fenotipo Ntr^- , que en organismos

diazotróficos incluye la fijación de nitrógeno. Como ejemplo ya se mencionó previamente el fenotipo Nif^- que presentan las mutantes de *Rhizobium* cuya GS se encuentra altamente adenilada.

En *Azospirillum brasilense*, el grupo de Bani *et al.*, (1980) ha aislado mutantes en el gene que codifica para la glutamato sintasa (GOGAT). Estas fueron seleccionadas por su crecimiento en NH_4^+ alto, 25 mM, y simultáneamente incapacidad para fijar nitrógeno. Estas mutantes no presentaron actividades detectables de GOGAT. Cuando se analizó el comportamiento Ntr de estas mutantes por crecimiento en diferentes sustratos Ntr, se encontró que no crecen en histidina, adenina, alanina, xantina y nitrógeno molecular. Tampoco crecen en nitratos o nitritos como únicas fuentes de nitrógeno. Sin embargo, sí crecen en amonio alto, glutamina, arginina, glutamato, aspartato, asparagina y prolina. Presentaron actividades de GS muy bajas, no inducibles en ninguna condición y bastante adeniladas. Interesantemente algunas de sus mutantes presentaron actividades de deshidrogenasa glutámica (GDH) reducidas al 50% de las actividades silvestres, para lo cual no se brindó una explicación. A la luz de las características de sus mutantes, Bani *et al.* (1980) propusieron la existencia de mecanismos de regulación Ntr semejantes a los encontrados en enterobacterias.

Por otra parte, Plasinski y Rolfe (1983) realizaron experimentos con 8 cepas de *A. brasilense* y *A. lipoferum* para determinar el número de plásmidos de cada una de estas cepas y la distribución de la información para la fijación de N_2 en este organismo. Utilizando el método reportado por Kado y Liu (1981), para purificación de plásmidos de alto peso molecular, con algunas modificaciones, obtuvieron un perfil de plásmidos. Encuentran que existe gran variación respecto al número y peso molecular de los plásmidos de cada cepa. El rango de los pesos moleculares varía desde 12 hasta 370 megadaltones. La cepa de *A. brasilense* Sp7 ATCC29145 (cepa silvestre utilizada en este trabajo de tesis) contuvo 4 plásmidos, de 100, 130, 350 y 370 megadaltones. Para la localización de los genes estructurales *nif* en *Azospirillum*, utilizaron como probador génico el plásmido pW564, derivado del pBR328, que contiene los genes *nifHD* de *Rhizobium trifolii*. El DNA total de las 8 cepas digerido con *EcoRI*, lo hibridaron contra pW564. En todos los casos la hibridación específica se localizó en fragmentos cromosomales que en ningún caso correspondieron a las bandas de plásmidos. También hibridaron el DNA total de *Azospirillum* con DNA de *nifHDK* de *K. pneumoniae*, y los resultados se repitieron, por lo que en *Azospirillum* los genes *nifHDK* parecen estar localizados en cromosoma.

Otro dato que confirma la afirmación anterior es la existencia de una cepa de *Azospirillum* de la cual fueron curados los plásmidos. Esta cepa siguió siendo Nif^+ . En los *Rhizobia* de crecimiento rápido se ha demostrado que algunos de los genes que controlan las propiedades simbióticas están localizados en plásmidos de alto peso molecular (Beynon *et al.*, 1980; Banfalvi *et al.*, 1981). Si bien los genes estructurales para la nitrogenasa en *A. brasilense* se localizan en cromosoma, aún no ha sido descartada la posibilidad de que en este organismo los genes

con funciones semejantes a los de asociación bacteria-raíz estén codificados en alguno de sus plásmidos.

Gauthier y Elmerich, (1977) han aislado mutantes de *A. brasilense* auxótrofas de glutamina y concomitantemente Nif^- . Al analizar el comportamiento enzimático de la GS de dichas mutantes, estos autores encontraron dos diferentes fenotipos. Uno caracterizado por ausencia completa de actividad de GS, tanto biosintética como de transferasa, una incapacidad para crecer en NH_4^+ bajo 2 mM, en glutamato 1 mg/ml o en NH_4^+ 20 mM, y por ausencia completa de actividad de nitrogenasa determinada por el ensayo de reducción de acetileno. El segundo fenotipo se caracterizó por una incapacidad de crecer en glutamato 1 mg/ml y NH_4^+ 2 mM, pero que presentaron crecimiento residual en 20 mM de NH_4^+ . Estas mutantes presentaron alrededor de un 30% de la actividad silvestre de nitrogenasa en ausencia de amonio o en presencia de glutamina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y alrededor de un 200% de actividad de reducción de acetileno en presencia de NH_4^+ 20 mM; también presentaron actividad residual de GS, entre un 10% y un 20%, comparado con los niveles de la cepa silvestre.

Al aislar revertantes protótrofas a partir de las mutantes antes mencionadas, encontraron los siguientes fenotipos. Las revertantes del primer grupo presentaron actividades de GS de alrededor de un 25% de la actividad silvestre, actividades de nitrogenasa similares a las de la cepa silvestre y volvieron a ser sensibles a la represión causada por NH_4^+ . Las revertantes del segundo grupo se comportaron de manera similar, sólo que las actividades de GS fueron casi las de la silvestre, quizá un poco más bajas, y los valores de reducción de acetileno fueron equivalentes a los de la silvestre así como su sensibilidad al NH_4^+ . Tanto las revertantes del primer grupo como las del segundo grupo presentaron niveles de adenilación de la GS totalmente normales. A la luz de estos resultados, ellos propusieron que posiblemente en *Azospirillum brasilense* la regulación de la GS estuviera sujeta a un sistema de regulación que controla la biosíntesis de la nitrogenasa.

Posteriormente, Elmerich (1985) clonó el gene de glnA de *A. brasilense* valiéndose de un banco de genes que el grupo de este mismo autor construyó (Quiviger *et al.*, 1982), utilizando para la detección de la clona positiva un probador específico de glnA de *K. pneumoniae*. La clona, designada pAB44, fue capaz de restablecer el fenotipo silvestre a algunas mutantes $\text{Gln}^- \text{Nif}^-$ de *K. pneumoniae* y de *A. brasilense*. Por análisis en maxicélulas en *E. coli*, estos autores identificaron el producto del pAB44 como una proteína de 50 Kd (coincidente con el peso molecular reportado para la GS), con actividad de GS. Aún no se ha determinado si dicha clona contiene también una región con funciones semejantes a ntrBC (glnLG).

Objetivo del Proyecto de Tesis

El objetivo trazado para este proyecto fue el aislamiento de mutantes revertantes para la fijación de N_2 en *Azospirillum brasilense* Sp7. Debido a que este organismo ya fija N_2 en vida libre en condiciones en las que la presión parcial de O_2 es suficientemente baja, así como en

crecimiento en condiciones de microaerofilia (consistente en cultivos en medio semisólido, lo que les permite crecer a una distancia de la superficie de algunos milímetros, en donde encuentran la presión parcial de O₂ adecuada para que no inactive su nitrogenasa), se presentaba el problema de seleccionar a aquellas mutantes que fijaran el N₂ en forma constitutiva de las células que fijaran N₂ como una capacidad ya propia en este organismo. Es decir, que dichas mutantes pudieran ser diferenciadas fenotípicamente de la silvestre sin tener que recurrir a probar individualmente cientos de sobrevivientes a un tratamiento mutagénico dado. Por esta razón se decidió buscar una estrategia que permitiera seleccionar dichas mutantes revertantes en fijación de N₂, algunas de las cuales serían constitutivas.

En el momento en que esta tesis se inició, en nuestro laboratorio habíamos logrado la obtención en *E. coli* de mutantes constitutivas para la GS por medio del aislamiento de mutantes resistentes a metionina sulfoximina (MS) a partir de una cepa conteniendo una mutación en glnG. La mutante en glnG le confiere en *E. coli* sensibilidad a MS. De esta manera se pensó que el mismo razonamiento podía utilizarse en *A. brasilense* para el sistema nitrogenasa, siempre y cuando el sistema nitrogenasa fuera activado en *Azospirillum* por glnG (ntrC) y glnF (ntrA) como en enterobacterias. Además este mismo enfoque experimental se pensó que nos hubiera servido para demostrar si el sistema ntrC-ntrA (glnG-glnF) podía activar los genes nif en *Azospirillum* como se sospechaba en otros organismos diazotróficos.

Así, basándonos en un modelo de regulación del metabolismo nitrogenado como el descrito anteriormente, planteamos la siguiente hipótesis experimental. Para obtener mutantes constitutivas para la fijación de N₂, suponiendo que la regulación nitrogenada en *Azospirillum* ocurriera como en enterobacterias, sería necesario eliminar el regulador general de activación de las vías de utilización de nitrógeno ntrC, y posteriormente mediante un segundo paso de mutagénesis, generar un promotor independiente de activación-represión por los genes reguladores de la transcripción nif, en la región del promotor de los genes estructurales para la fijación de nitrógeno, nifHDK, o bien un promotor constitutivo en la región de los genes reguladores para nif, nifLA. Se decidió seleccionar el primer tipo de mutantes por sensibilidad a MS (siguiendo los resultados encontrados para *E. coli*), o bien para fenotipo Ntr⁻. En este trabajo se describe la obtención y caracterización genética y fisiológica de mutantes alteradas en parte de estos sistemas Ntr y concluimos que en *Azospirillum brasilense* existen algunas diferencias en la regulación Ntr comparada con *K. pneumoniae*.

Asimismo se describe la obtención de mutantes revertantes para la fijación de nitrógeno, que fueron seleccionadas por recuperación de su capacidad de fijar N₂. Para el diseño experimental de la obtención de mutantes constitutivas para la fijación de N₂, se siguió prácticamente la estrategia utilizada en *E. coli* para aislar mutantes constitutivas para glutamino sintetasa que con tanto éxito habíamos obtenido en el laboratorio (Osorio et al. 1984). Partimos de la suposición de que los productos de glnG y glnF podrían ser activadores tanto de glnA como de nifLA, tal y como sucede en *K. pneumoniae* (Espín et al., 1982); ya que en *E. coli* habíamos podido aislar mutantes gln^G como revertantes de mutantes glnG, no resultaba

difícil suponer que el mismo procedimiento pudiera seguirse en *Azospirillum*, siempre y cuando en esta última bacteria existiera un sistema ntrA-ntrC que activara tanto glnA como nifLA.

Como antecedente adicional existía el trabajo publicado por Ausubel *et al.*, (1977) en el que describe la obtención de mutantes de *K. pneumoniae* capaces de desreprimir la actividad de nitrogenasa independientemente de la actividad de la glutamino sintetasa. En la época en que este trabajo fue realizado, aún prevalecía la concepción de que era la glutamino sintetasa por sí misma la que regulaba la actividad de los sistemas Ntr. No obstante esto, Ausubel (1977) hace la distinción entre los dos fenotipos encontrados por mutaciones en la región de glnA, aquellas que eran Gln^- y las que se presentaban como $\text{Gln}^+ \text{Hut}^- \text{Nif}^-$, a las que definieron genotípicamente como $\text{glnR}_{\text{nif}}^- \text{R}_{\text{hut}}^-$.

La estrategia descrita por Ausubel (1977) fué la siguiente: (1) obtener mutantes que fuesen auxótrofos de glutamina, (2) a partir de las Gln^- aislar mutantes $\text{Gln}^+ \text{Hut}^- \text{Nif}^-$, (3) a partir de éstas aislar revertantes Nif^+ . Obtuvieron revertantes $\text{Gln}^+ \text{Hut}^- \text{Nif}^+$ que cotransducían 100% con glnA y 8-12% con rha, que está casi contiguo a glnA. Para evitar obtener revertantes en el locus para glnA y si encontrarlas en la región de promotor de nif, partieron de una mutante que además del genotipo anteriormente mencionado era hisD, ya que este gene está localizado en el cromosoma en la región contigua a los genes nif. Así, las revertantes aisladas fueron 30-50% cotransducibles con hisD. A estas mutantes se les designó nifT. Las características sobresalientes de estas mutantes son: (a) son cis dominantes (b) mapean a la mitad del acúmulo de genes nif (c) siguen siendo sensibles a represión por NH_4Cl (d) en cepas que contienen tanto la mutación nifT como gln^{C} (constitutivas para la glutamino sintetasa), la síntesis de nitrogenasa se ve reprimida por la presencia de amonio, en tanto que mutantes que sólo llevan gln^{C} son constitutivas para la síntesis de nitrogenasa.

Hoy día sabemos que las mutaciones que dan por fenotipo una incapacidad para desreprimir los operones de utilización de histidina y de la fijación de N_2 en *K. pneumoniae* se localizan en ntrC. Partiendo de la actualización de esta información, nos pareció que el enfoque que nos habíamos planteado era el adecuado a seguir.

Materiales y Métodos

Medios y condiciones de cultivo

Como medio rico se utilizó Luria, consistente en extracto de levadura 5 g/l, bactotripton 10 g/l y NaCl 10 g/l.

Medio Mínimo utilizado para *Azospirillum brasilense* (1 l pH 6.8-7.2)

K_2HPO_4		6 g
KH_2PO_4		4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	al 10%	2 ml
NaCl	al 10%	1 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	al 10%	2 ml
micronutrientes*		2 ml
$FeCl_3$	al 0.1%	0.5 ml
KOH		4.5 g
vitamina**		1 ml
ácido succínico		5 g

Solución de micronutrientes* (200 ml)

0.2 g	$Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$
0.235 g	$MnSO_4 \cdot H_2O$
0.28 g	H_3BO_3
0.008 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
0.024 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

vitamina** (100 ml)

10 mg biotina
20 mg piridoxal.HCl

* Autoclavar.

** Disolver en baño maría y filtrar.

Este medio se suplementa con una fuente de N, que esencialmente fue NH_4Cl 25 mM, NH_4Cl 2.5 mM o glutamina 2 mg/ml. Asimismo, dependiendo de la cepa, los requerimientos que se adicionaron fueron en su mayoría metionina 40 $\mu g/ml$ o histidina 50 $\mu g/ml$. Los antibióticos se utilizaron a las siguientes concentraciones, excepto cuando se especifique diferente: Km 50 $\mu g/ml$, Tc 10 $\mu g/ml$, Prm 100 $\mu g/ml$. Para medio sólido para cultivos en caja se utilizaron 15 g/l de bactoagar. Para medio semisólido para cultivos en microaerofilia se utilizaron 1.8 g/l de agar. Todas las cepas de *Azospirillum* se crecieron siempre a 30°C, temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria, así como permisiva para la inducción y funcionamiento de la nitrogenasa. Para las cepas de *E. coli* portadoras de plásmidos se utilizó

Luria suplementado de algún antibiótico (según la resistencia conferida por el plásmido). La temperatura de crecimiento para este organismo fue de 37°C.

Protocolo de mutagénesis con EMS

Las células se crecen en medio mínimo hasta fase exponencial en un volumen de 5 ml. Se centrifugan y resuspenden en la mitad del volumen, i.e. 2.5 ml de sales sin fuente de carbono ni de nitrógeno. A 2.4 ml de sales se les adiciona 0.1 ml de EMS. Se juntan las células con la solución de EMS, y se dejan incubando durante 2.5 hrs. sin agitación a 30°C. Para inactivar el EMS se centrifugan y se resuspenden en 1 volumen de tiosulfato de Na al 5%. Este paso se repite dos veces. Luego se resuspenden las células en 5 ml de medio rico LC (luria) y se dejan recuperar hasta fase exponencial tardía. Se centrifugan y se lavan dos veces en sales sin C/N. Se depletan un par de horas y luego se resuspenden en el medio mínimo selectivo en el que las mutantes deseadas no sean capaces de crecer y se les adiciona 1 ml de Km al 1% durante 12 hrs., después de lo cual se lavan las células por lo menos dos veces y se resuspenden en medio mínimo completo hasta fase exponencial. Se hacen diluciones hasta 1×10^{-6} y se platean en el mismo medio en el que se les permitió llegar hasta exponencial. De ahí se toman las colonias aisladas y se parchan en los diferentes medios selectivos.

Mutagénesis con EMS en sólido

Esencialmente el protocolo es el mismo que el anterior excepto que después del paso de la recuperación en LC y los lavados en salina, se espatulan las células directamente en cajas conteniendo el medio mínimo en el que las mutantes de interés no pueden crecer y al cabo de 20 hrs. de incubación a 30°C se espatulan con Km para una concentración final de 1 mg/ml, y se dejan por espacio de 36 hrs. en incubación. Pasado este lapso, se recoge el crecimiento mediante el auxilio de una espátula y se lavan las células por lo menos dos veces, después de lo cual se diluyen y espatulan en el medio mínimo completo. Luego se parchan en los diferentes medios de selección.

Protocolo de mutagénesis con el P1CmTn5Km

Se crecen las bacterias en medio rico LC hasta 40 u. Klett. (aprox. 1×10^8 células/ml). Se centrifugan y resuspenden en 1 ml de LC. Agregar 1 ml de solución Ca-Mg (0.03M CaCl_2 , 0.015M MgSO_4) y 1 ml de LC+fago según la multiplicidad de infección. Dejar 90 min. a 30°C sin agitación. Centrifugar y resuspender diluyendo 1:10 en LO1. Separar en varios matraces. Dejar expresando hasta exponencial temprana. Añadir Km a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ (la presencia del Tn5 le confiere resistencia a 50 $\mu\text{g/ml}$ de Km a la cepa receptora) y dejar llegar el cultivo hasta fase exponencial tardía. Para el enriquecimiento se centrifugan y lavan las células en salina y se dejan depletando 12 hrs. después de lo cual se

resuspenden en medio mínimo en el que las mutantes de interés no pueden crecer y se les adiciona paromomicina 500 $\mu\text{g/ml}$ (concentración final) permitiéndoles crecer durante 6 hrs. Lavar por lo menos dos veces y resuspender en medio mínimo completo más Km 50 $\mu\text{g/ml}$ y dejar creciendo hasta exponencial temprana. Hacer diluciones, platear y parchar en los medios de selección.

Propagación del fago

- 1.- Crecer la cepa MX1055 a 30°C en LC + MgSO_4 0.01 M concentración final, en un volúmen de 50 ml (45 ml LC + 2.5 ml MgSO_4 0.2M + 2.5 ml "overnight").
- 2.- Centrifugar y resuspender en LC concentrando 5 veces (50ml \rightarrow 10ml).
- 3.- Incubar con agitación a 40°C por 2 hrs.
- 4.- Pasar a 37°C por una y media hrs.
- 5.- Cloroformar 1:20, centrifugar y volver a cloroformar.
- 6.- Titular en AB1157 (concentrar las células al doble en la solución de Ca-Mg, y poner en contacto 0.1 ml de células de AB1157 y 0.1 ml de fagos, dejar a 37°C por 20 min); diluir en LC y plaquear en LCTG (LC, timina, glucosa) con agar suave. Contar las placas obtenidas e infectar para la mutagénesis a la multiplicidad de infección que se desee. Para multiplicidad de infección de 0.1 = 10 bacterias/fago

Si el título del fago es $1 \times 10^9/\text{ml}$ y tenemos un cultivo con $1 \times 10^8/\text{bacterias/ml}$, tomamos 10 ml de cultivo = $1 \times 10^9/\text{bacterias}/10 \text{ fagos} = 1 \times 10^8$ p.f.u (unidades formadoras de placas) \rightarrow 0.1 ml fago/10 ml bacterias.

Multiplicidad 0.05 = 20 bacterias/fago para 5 ml cultivo \rightarrow 5×10^8 bacterias/20 fagos = 2.5×10^7 p.f.u. título del fago $1 \times 10^9/\text{cada } 0.1 \text{ ml} \rightarrow 25 \mu\text{l}$ de fago. A la hora de poner el fago y las células juntas, es importante que los volúmenes sean iguales; ésto es, ej.:

1 ml LC
1 ml Ca-Mg
0.5 ml fago
0.5 ml LC

para 10 ml
de cultivo

Determinación de la actividad de glutamino sintetasa (GS)

Ensayo de transferasa

Esencialmente se siguió el protocolo reportado por Bender *et al.* (1977), a excepción de pequeñas modificaciones en el tratamiento de las células. Los pasos que se siguieron fueron:

- 1.- Crecer "overnight" en medios mínimos pertinentes, i.e. NH_4Cl 25 mM, 2.5 mM, y glutamina 2 mg/ml (la glutamina se debe preparar fresca).
- 2.- Inocular 10 ml de medio a una densidad de 15 u. Klett y crecer hasta 100 u. Klett.
- 3.- Adicionar 2 ml de CTAB (1 mg/ml) (detergente aniónico).

- 4.- Continuar agitando por 10 min.
- 5.- Pasar a hielo por 10 min, centrifugar (5000 rpm por 10 min).
- 6.- Lavar con un volúmen de KCl 1%, centrifugar y resuspender en 1 ml de KCl 1%.
- 7.- Dejar en hielo hasta el momento de realizar la determinación.

Mezcla de reacción

GS Total = ensayo de transferasa sin Mg^{++}

agua bidestilada	14.0 ml
imidazole 1 M pH 7.33	4.5 ml
NH_2OH 0.6 M	0.74 ml
$MnCl_2$ 0.1 M	0.09 ml
arseniato de Na 0.28 M pH 7.33	3.0 ml
ADP sódico 20 mM pH 7.0	0.6 ml
CTAB (1 mg/ml)	3.0 ml
L-glutamina 0.2 M	4.125 ml

aforar a 33 ml
ajustar a pH 7.33

GS transferasa con Mg^{++} = GS no adenilada

Todo igual, sólo que la mezcla lleva $MgCl_2$ 3 M 0.66 ml/ 33 ml.

Para cada ensayo 37°C

0.4 ml mezcla
0.1 ml bacterias

A los 5 min parar la reacción con 1 ml de "Stop Mix"

A los 10 min parar la reacción con 1 ml de "Stop Mix"

Tomar un tiempo cero.

Centrifugar 20 min a 2500 rpm

Leer a 540 nm, considerar que 1 micromola de gama-glutamihidroxamato lee 0.532 a 540 nm.

Para obtener la actividad específica se resta el valor cero de los valores de 5 min y 10 min, se multiplica el valor de 5 min por 2, se le suma el valor de 10 min, se divide entre 2, se divide entre 10, se divide entre 0.532 y por último se divide entre el valor de 100 μg /proteína.

Determinación de la actividad de glutamato sintasa (GOGAT)

Se siguió esencialmente el procedimiento reportado por Meers *et al.* (1970), los pasos que se siguieron fueron:

- 1.- Crecer "overnight" en medio mínimo deseado.
- 2.- Inocular a 15 u. Klett 25 ml y dejar crecer hasta 100 u. Klett
- 3.- Centrifugar 12 min a 8000 rpm.
- 4.- Lavar dos veces con 12.5 ml de buffer de extracción.

- 5.- Resuspender el pellet en 1 ml de buffer de extracción que contenga 2.25 mM MnCl₂ concentración final (concentrar las células 25×).
- 6.- Sonicar y centrifugar a 4°C.
- 7.- Recuperar sobrenadante y dejar en hielo.

Buffer de Extracción para 500 ml
 EDTA 0.5 mM
 K₂HPO₄ 5 mM pH 7.2
 CTAB (1 mg/ml) añadir 1/10 volúmen

Solución Stock MnCl₂ 0.225 M (100 veces concentrada)

Mescla de Reacción
 alfa-cetoglutarato 0.2 M pH 7.6
 glutamina 50mg/ml
 NADPH 6 mg/ml (en buffer de ensayo - Tris)
 Tris 0.1 M pH 7.8

Coctel:	Coctel control:
0.3 ml glutamina	0.3 ml H ₂ O
0.5 ml alfa-ceto	0.5 ml alfa-ceto
4.5 ml Tris	4.5 ml Tris
3.7 ml H ₂ O	3.7 ml H ₂ O

Ajustar blanco con coctel control a 340 nm.

Mesclar en la celda:	0.45 ml coctel
	0.40 ml buffer extracción
	80 µl NADPH
arrancar reacción:	0.1 ml extracto células

Tomar tiempo cero, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min y observar el decaimiento de la absorción de luz del NADPH conforme se consume durante la reacción. Se considera que 0.1 micromolas de NADPH absorben 0.62 a 340 nm. El valor de la actividad específica se obtiene restando el valor del último tiempo leído en el que todavía se observa un decaimiento lineal, del valor de cero; éste se divide entre el número de min. Se hace lo mismo con el control, y se le resta el valor del control al valor obtenido. Se hace una regla de tres con el valor de NADPH y se divide entre el valor de 100 µg/proteína, con lo que se obtienen las actividades específicas.

Determinación enzimática de histidasa

De acuerdo al protocolo reportado por Pahel *et al.* (1982), se siguieron los pasos descritos a continuación:

- 1.- A partir de un "overnight", se inocularon los cultivos en MM suplementado con una fuente de carbono, NH₄Cl 2.5 mM y L-histidina 50 µg/ml.

2.- Cuando hubieron llegado a una densidad aproximada de 4×10^8 células/ml, se les adicionó CTAB a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ y MnCl_2 a una concentración final de 1.0 mM y se les dejó en agitación durante 2 min, después de lo cual se pasaron a hielo. Se centrifugaron y se lavaron en un volúmen de KCl al 1%, posteriormente se concentraron 25 veces el volúmen inicial y se resuspendieron en una solución que contenía 20 mM imidazole (pH 7.5), 0.3 mM MnCl_2 , y 100 $\mu\text{g/ml}$ CTAB, y se dejaron en hielo hasta el momento de realizar las determinaciones ensimáticas. Mezcla de reacción consistió en 20 $\mu\text{g/ml}$ CTAB, 100 mM dietanolamina, 5 mM glutatión y 10 mM L-histidina (pH 9.4), todo ésto aforado a 1 ml con agua bidestilada. La reacción se inicia al momento de adicionar entre 5 y 25 μl de las células tratadas. Como blanco se utilizó la mezcla de reacción sin células. Se midió la formación e incremento de urocanato a 277 nm a 37°C. Las actividades específicas se reportan como nanomolas de urocanato/min/mg proteína.

Cuantificación de proteínas

Se realizaron por el método reportado por Lowry (1951).

Purificación de glutamino sintetasa por el método de precipitación con polietilenglicol

Por el método reportado por Streicher y Tyler (1980).

Soluciones stock de polietilenglicol (PEG) al 40% y NaCl 4 M se prepararon en buffer SB.

Buffer SB.

20 mM imidazole

10 mM MgCl_2

2 mM beta-mercaptoetanol.

- I. Se cultivó un volúmen de 1 l de células en MM suplementado con una fuente de carbono y L-glutamina 2 mg/ml como fuente limitante de nitrógeno (condición en la cual la síntesis de GS es la más elevada) hasta una densidad de 40 u. Klett = 1×10^8 . Se centrifugaron y se concentraron 100 veces las células en buffer SB. Se sonicaron a una temperatura de 0 a 4°C. Los restos celulares se eliminaron centrifugando por 45 min a 17,000 rpm. Se recupera el sobrenadante con pipeta y se colecta en tubos estériles.
- II. A 1 volúmen de extracto agregar, goteando con agitación, un volúmen igual de PEG 20% preparado en buffer SB. 10 min después se centrifuga a 15,000 rpm por 15 min. Se debe obtener un paquete (P1) compacto y un sobrenadante perfectamente claro. De lo contrario volver a centrifugar.
- III. La pastilla P1 se resuspende en 4 M de NaCl preparado en buffer SB, en la mitad del volúmen del extracto original a 4°C. Para obtener la máxima solubilización se utiliza un homogenizador de vidrio. Se forma una solución clara que contiene del 80% al 90% de la actividad de GS.

IV. Se centrifuga y se colecta el sobrenadante S1; se precipita en un volúmen igual de PEG al 20% -2 M NaCl en buffer SB. Se deja a 4°C y 10 min después se centrifuga a 15,000 rpm 15 min. El sobrenadante S2, es pipeteado cuidadosamente evitando contaminarlo con el pellet P2.

V. La fracción S2 se mantiene en hielo y se le agrega la mitad del volúmen que se tiene de acetona a -20°C añadiendo rápidamente y con agitación. El precipitado formado se centrifuga por 15 min a 15,000 rpm. Se decanta el sobrenadante y se seca el remanente líquido por aereación (estéril).

VI. El pellet se resuspende en 1/10 volúmen original del extracto en buffer de columna.

Buffer de columna.

20 mM imidazole pH 7.5

1 mM MgCl₂

10% glicerol.

Fue necesario utilizar un homogenizador para solubilizar el pellet P3, para asegurar la máxima recuperación de GS. El homogenado fue centrifugado a 15,000 rpm por 15 min y el sobrenadante S4 fue cuidadosamente colectado. Se guardó a 4°C. Se tomaron alícuotas para realizar el ensayo de actividad por transferasa, así como también se corrieron geles de proteínas para determinar el peso molecular de la(s) proteína(s).

Purificación de DNA cromosomal

De acuerdo al método reportado por Quiviger *et al* (1982), y con modificaciones reportadas por Marmur (1961). Los pasos seguidos fueron:

1.- Se creció 1 l de células en medio PAY (Peptona de caseína 4 g/l; MgSO₄ 2 mM y 0.48 g/l de extracto de levadura, pH 7.2) en oscuridad (con objeto de que produzcan la menor cantidad de polisacáridos posible), con agitación a 30°C. (Para las cepas Km^r se le adicionó Km a una concentración final de 50 µg/ml).

Por cada 2 g de células:

2.- Resuspender en 15 ml de una solución 50 mM Tris-HCl pH 8.0, sacarosa 25%.

3.- Adicionar 20 mg de lisosima y 40 mM EDTA; incubar a 37°C 10 min.

4.- Adicionar SDS 1% concentración final y proteinasa K 10 mg o pronasa 10 mg de una solución 20 mg/ml predigerida una y media hrs a 37°C; incubar el lisado hasta que clarifique a 37°C, alrededor de 2 hrs.

5.- Pasar el lisado claro un par de veces por una jeringa de plástico.

6.- Calentar el lisado claro a 70°C durante 20 min e inmediatamente adicionar un volúmen de fenol:cloroformo:isoamílico, 20:20:1; agitar bien, centrifugar y tomar fase acuosa. Repetir este paso dos o tres veces, hasta que la fase acuosa esté transparente.

7.- Adicionar un volúmen de cloroformo:isoamílico, centrifugar y tomar fase acuosa, repetir este paso dos o tres veces.

- 8.- Precipitar adicionando 2 volúmenes y medio de etanol a -20°C y 200 mM de acetato de Na, dejar a -20°C toda la noche, centrifugar y lavar con etanol al 70% dos o tres veces, secar y resuspender en 1 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).
- 9.- Adicionar RNAsa pretratada a una concentración final de 0.01 mg/ml, incubar 30 min a 37°C .
- 10.- Repetir pasos 6-8, resuspendiendo en el volumen más pequeño posible.

Purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina

Se siguió el protocolo reportado por Maniatis (1982).

Electroelución de fragmentos de DNA

Se digieren los DNA's con las enzimas de restricción desecadas y se corren geles de agarosa ultra pura al 1% en buffer Tris-Acetatos-EDTA 0.25x. Se tiñen los geles con bromuro de etidio 1 mg/ml y se corta el fragmento de interés. Este se corta en pedasos y se coloca en un cámara de electroelución conteniendo buffer Tris-Acetatos en ambos posos. Se corre a 120 volts por 5 hrs a 4°C . Al cabo de este tiempo se invierte la polaridad durante 1 min para desprender el DNA, se colecta el volumen de electroelución y se extrae con un volumen de fenol lo más frío posible; se agita vigorosamente durante 1 min, se centrifuga y colecta la fase acuosa, se extrae con cloroformo y luego se precipita con dos y medio volúmenes de etanol -20°C y 200 mM acetato de Na. Se centrifuga, se lava y se seca; luego se resuspende en buffer TE.

Hibridización

Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa

Se corren geles de agarosa 1% de 3 mm de grosor con el DNA digerido, de preferencia a bajo voltaje para que los fragmentos se separen bien por peso molecular. Se tifie el gel en EtBr 1 mg/ml y se le saca foto. El gel se trata en HCl 0.25 M por 15 min. Se lava dos veces en agua destilada. Se cambia a una solución de NaOH 0.5 M y NaCl 1 M en la cual se deja durante 20 min dos veces, después de lo cual se pasa a una solución neutralizante de Tris 1 M y NaCl 3 M pH 7.5 durante 30 min 2 veces. El gel se coloca sobre un puente de papel Whatmann 3 mm y un filtro de nitrocelulosa del tamaño del gel previamente humedecidos en una solución SSC 6x, se le coloca un papel Whatman 3 mm del mismo tamaño encima, muchas sanitas y un peso de medio kilogramo y se deja transferir durante por lo menos 12 hrs aunque de preferencia 24-48 hrs., después de lo cual el papel de nitrocelulosa se seca al vacío a 80°C . Está listo para la hibridización.

Mescla de prehibridización e hibridización

En general se usó la formamida al 40%, aunque también se realizaron experimentos con formamida al 25% y al 35% con el objeto de establecer si es que una disminución en la concentración de formamida podía permitir el apareamiento de DNA's con secuencias más disímiles que 70%.

(10 ml con formamida al 40% para DNA's heterólogos hasta un 30% de disparidad en la secuencia)

4 ml formamida desionizada

2.5 ml 20× SSC

0.1 ml SDS 10%

0.04 ml EDTA 0.25 M

0.1 ml Tris 1 M

0.1 ml Denhardt 100×

500 µg/ml DNA timo de ternera desnaturalizado por ebullición durante 10 min

agua c.b.p. 10 ml

Para la mescla de hibridización solamente se le adiciona el volúmen de DNA radioactivo previamente hervido durante 10 min, y se le resta ese volúmen de agua. El filtro se prehibridiza en la solución de prehibridización a 42°C durante 8 a 12 hrs en una bolsa sellada. Mientras tanto se marca por "nick translation" el detector que se va a utilizar, para lo cual se siguen los siguientes pasos:

		Receta general
DNA 1 µg	1 µl	
dNTP's	20 µl	
(ATG)		
Solución de ensima	10 µl	
dCTP <alfa ³² P>	10 µl	
(10 µCi/µl) act. esp.		
H ₂ O c.b.p	100 µl	

Incubar a 15 - 16°C por 2 hrs.

Llevar a un volúmen de 300 µl con buffer de elución y pasar por una columna de Sephadex G-75 a la que previamente se le ajustó el pH 8.0. Pasar por la columna 600 µl más de buffer de elución. Dejar salir el primer volúmen de elución y coleccionar los 600 µl restantes en un tubo eppendorf y dejar en hielo. Para determinar la actividad específica tomar una alícuota y precipitarla en TCA 10% en presencia de DNA acarreador y medir en un contador de centelleo. Tomar el volúmen equivalente al número de cuentas por min decaídas, ebullición 10 min, y adicionar a la mescla de hibridización. Sacar todo el líquido de la bolsa de prehibridización y sustituir por la mescla de hibridización. Dejar a 42°C durante 12-24 hrs.

Lavados

Sacar el líquido de hibridización e inyectar 20 ml de $2\times$ SSC-0.1% SDS. Vaciar este líquido, abrir la bolsa, sacar el filtro y ponerlo en $2\times$ SSC-0.1% SDS a temperatura ambiente por 15 min, después de lo cual volver a poner en la misma solución pero a 50°C en baño maría durante media hora; verificar con el contador Geiger si el fondo del filtro ya no muestra radioactividad inespecífica. Si aún hay mucho fondo, se cambia la solución SSC-SDS cada hora y se puede ir bajando la concentración de la salina, con lo que la restrictividad del lavado se aumenta. Cuando el filtro ya no presenta fondo inespecífico, se lava sin SDS, pero en la concentración de salina a la que se llegó, por 15 min. Se seca el filtro a 65°C por 15 min y se coloca entre dos placas fotográficas a -70°C desde 12 hrs. hasta por dos semanas, según el tiempo de exposición que se desee.

Resultados

En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización genética de mutantes regulatorias incapaces de fijar nitrógeno y de mutantes constitutivas para la fijación de nitrógeno en *Azospirillum brasilense*.

La cepa silvestre que utilizamos fue *A. brasilense* Sp7 (ATCC29145). A partir de ella se aislaron en este laboratorio mutantes auxótrofas de algún aminoácido. Para este trabajo se utilizaron las cepas MX2033 (Sp7 Met⁻) y la MX2036 (Sp7 His⁻) (aisladas por S. Loria y M. Zamudio), aprovechándonos de la auxotrofia como un marcador genético. Las mutantes regulatorias Nif⁻ fueron aisladas por estrategias diferentes.

Mutagénesis por etilmetanosulfonato (EMS) y selección para sensibilidad a metionina sulfoximina (MS)

Basándonos en el modelo de regulación encontrado para *Klebsiella pneumoniae*, en el cual la ausencia del producto de *ntrC* causa una incapacidad para fijar nitrógeno, y una hipersensibilidad a la inhibición de crecimiento causada por el análogo del ácido glutámico, la D-metionina L-sulfoximina (MS), decidimos buscar mutantes de *A. brasilense* seleccionando para el fenotipo MS^S. El objetivo consistió en averiguar si el sistema de regulación *ntrC-ntrA* previamente descrito en enterobacterias, se encuentra presente y es funcional en *A. brasilense*.

Para ello se determinó la respuesta de la cepa silvestre MX2033 Met⁻, a varias concentraciones de MS tanto en medios líquidos como en medio sólido. Se encontró que a 100 µg/ml de MS o a concentraciones mayores que ésta, la cepa silvestre es inhibida. Para crecimiento en líquido decidimos usar una concentración de 50 µg/ml, ya que esta concentración es la máxima a la cual la cepa silvestre no es inhibida. La concentración que determinamos como óptima en medio sólido fue de 5 µg/ml para las MS^S, ya que en este medio la dosis permisiva subletal para la cepa silvestre fue de 10 µg/ml. Es interesante hacer notar, que en *A. brasilense* se observan diferencias claras entre las diferentes condiciones de cultivo y la respuesta en crecimiento de esta bacteria.

Después de la mutagénesis se seleccionaron aquellas colonias que no crecieron en las concentraciones de MS mencionadas, recuperándose en medio mínimo (MM) adicionado con NH₄Cl 25 mM y subsecuentemente probándose el crecimiento en MM adicionado de histidina, arginina o prolina como únicas fuentes de nitrógeno. No se encontró pleiotropía respecto a la sensibilidad a MS y la incapacidad en utilizar ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno, ni con respecto a la fijación de nitrógeno, pues las mutantes hipersensibles a MS crecieron en los aminoácidos mencionados como únicas fuentes de N, así como en ausencia de nitrógeno

combinado. En este primer intento por correlacionar los diferentes fenotipos Ntr bajo un denominador común, de alrededor de 3000 colonias parchadas en esos sustratos Ntr, no se pudo aislar ninguna que simultáneamente estuviera alterada en todos los sistemas Ntr probados. Por esta razón se descartaron todas las mutantes, lo que incluyó la fracción de la población que contenía las MS^S, Hut⁻ Nif⁻ y los fenotipos Hut⁺ y Nif⁺ encontrados posteriormente (ver más adelante).

Mutagénesis por EMS y selección para fenotipo Ntr⁻

Como otro método de obtención de mutantes en un locus análogo a ntrC en enterobacterias, se utilizó la selección para fenotipo Ntr⁻ (incapacidad para utilizar entre otros, histidina, arginina o prolina como fuentes únicas de N). Se mutagenizó la cepa MX2033 con etilmetanosulfonato (EMS) y se seleccionó para incapacidad simultánea para crecer en estos tres aminoácidos como fuentes únicas de N. Se probaron varios miles de sobrevivientes al tratamiento mutagénico y no se logró encontrar ninguna que presentara los tres fenotipos simultáneos. Aparecieron colonias a una frecuencia de 1×10^{-5} , que no crecieron en alguno de estos sustratos, pero que sí crecieron en los otros dos. Se repitió la mutagénesis seleccionando directamente en un coctel de histidina-arginina, con lo que resultaron colonias con crecimiento disminuido en ambos medios.

Por último, en otro intento, seleccionamos exclusivamente para la utilización de histidina Hut⁻, fenotipo que de los tres (Hut⁻, Aut⁻, Put⁻), se había presentado como el más claro. Obtuvimos mutantes a una frecuencia de 5×10^{-5} cuyo fenotipo fue Hut⁻ y que simultáneamente resultaron incapaces de fijar el nitrógeno molecular, Nif⁻. De este experimento se purificaron dos cepas, la MX2100 y MX2101 (Tabla 1). No satisfechos con estas mutantes, pues el fenotipo Ntr clásico no lo habíamos encontrado, reanudamos la búsqueda mediante una estrategia de mutagénesis y de selección diferentes.

Mutagénesis por inserción de Tn5

Para lograr la introducción e inserción del elemento de transposición genética, Tn5, en *A. brasiliense*, se hizo necesaria la construcción de un vector que mediara dicho evento. En nuestro laboratorio se construyó un fago P1 que lleva insertado un Tn5. El P1 Cm utilizado confiere resistencia a cloramfenicol (Cm), en tanto que el Tn5 confiere resistencia a kanamicina (Kan). El fago P1 no es estable en *A. brasiliense*. Sin embargo, como sí logra infectarlo, permite que se lleve a cabo la transposición del Tn5 y que éste quede insertado en el genoma, interrumpiendo las secuencias génicas. El P1 se segrega fácilmente cuando las bacterias infectadas se crecen en ausencia de cloramfenicol. Las mutantes se seleccionaron por resistencia a 50 µg/ml de kanamicina.

Posteriormente se realizó una segunda selección para el marcador de interés. En este caso nuestra selección fue directamente para incapacidad de fijar N_2 , utilizando como criterio de Nif^- una total ausencia de crecimiento en medio mínimo sin N combinado, suplementado sólo con una fuente de carbono, en cajas de Petri, condición en la cual la silvestre presenta crecimiento residual y confluyente. Bajo estas condiciones las bacterias no tienen la tensión parcial de O_2 óptima para la fijación de N_2 . Sin embargo poseen la suficiente cantidad de nitrogenasa para formar algo de amonio con lo que logran crecer de manera residual bajo estas condiciones. Es entonces un reflejo de la actividad de la nitrogenasa que si bien no está funcionando al óptimo, permite distinguir claramente aquellas bacterias que crecen bien en estas condiciones de las que no crecen en absoluto.

Después, a las colonias sospechosas de ser incapaces de fijar nitrógeno se les verificó dicho fenotipo por cultivo en condiciones microaerofílicas. En microaerofilia, dado que el medio contiene agar al 0.18%, las bacterias crecen formando una banda a cierta distancia de la superficie, i.e. en donde encuentran la tensión parcial de O_2 adecuada (0.01-0.05 atm o 0.5%) para el correcto funcionamiento de la nitrogenasa. Simultáneamente se parcharon en cajas con histidina como fuente de N y se purificaron sólo aquellas que al mismo tiempo fueran Km^R Hut^- Nif^- . Estas se encontraron a una frecuencia de entre 1×10^{-5} y 1×10^{-6} . Las cepas aisladas provenientes de mutagénesis independientes por inserción de $Tn5$, con fenotipo Hut^- Nif^- Km^R se denominaron MX2102, MX2103 y MX2104. (Tabla 1).

Aislamiento de mutantes Hut^- Nif^- por mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG)

El mutágeno NTG, actúa durante la replicación al nivel de DNA de cadena sencilla generando mutaciones múltiples en los sitios de replicación. Decidimos aislar un tercer grupo de mutantes por medio de una estrategia de mutagénesis diferente, utilizando NTG. Este mutágeno ofrece la particularidad de generar mutaciones múltiples, con lo que se obtienen con frecuencia cepas con más de una mutación en un sólo gene o en genes vecinos, y los fenotipos que se observan pueden estar dados por una sumatoria de las alteraciones mutagénicas. Seleccionamos las mutantes por fenotipo Hut^- y simultáneamente Nif^- . Se aislaron y purificaron dos cepas, la MX2105 y la MX2106 que presentaron el fenotipo deseado (Tabla 1).

Aislamiento de mutantes MS^S por inserción de $Tn5$

Decidimos volver a buscar mutantes hipersensibles al efecto de MS ésta vez mutagenizando con el P1 Cm $Tn5$, con el objeto de establecer el comportamiento de éstas por cuanto a sus fenotipos de asimilación de N. Fueron seleccionadas para Km^R e inhibición de crecimiento en caja a una concentración de 5 $\mu g/ml$ de MS. Se recuperaron tres clases de mutantes MS^S : (a) Hut^- Nif^- , (b) Hut^+ Nif^- y (c) Hut^+ Nif^+ . Las mutantes que se purificaron

se denominaron MX2107, MX2108 ($Hut^- Nif^-$), MX2109, MX2110 ($Hut^+ Nif^+$), Mx2111, MX2112 ($Hut^+ Nif^-$) (Tabla 1).

Crecimiento en sustratos Ntr

Con la intención de establecer qué tan general se presenta la regulación de sistemas Ntr en *A. brasilense*, probamos el crecimiento de la MX2033 y las mutantes MX2100, MX2101, MX2102, MX2103 y MX2104 en diferentes sustratos nitrogenados reportados (Tyler, 1978) como Ntr. Para ello crecimos todas las cepas en MM adicionado con NH_4^+ 25 mM en líquido hasta fase exponencial, después de lo cual se hicieron diluciones hasta 1×10^{-6} , y a partir de colonias aisladas se parcharon en MM suplementado con cada uno de los siguientes compuestos nitrogenados: histidina (2 mg/ml), arginina (2 mg/ml), prolina (2 mg/ml), alanina (2 mg/ml), serina (2 mg/ml), lisina (2 mg/ml), ácido glutámico (2 mg/ml), glutamina (2 mg/ml) y xantina (2 mg/ml). También se probaron en urea (2 mg/ml) y NO_3 (10 mM) como fuentes de N, por ser compuestos que pudieran estar bajo regulación Ntr, así como en ausencia de nitrógeno combinado en sólido y en microaerofilia.

Como se muestra en la Tabla 2, la cepa silvestre creció en todos estos sustratos, en tanto que las mutantes no crecieron solamente en histidina o en ausencia de N combinado. Las mutantes MS^S solamente fueron probadas en amonio alto (25 mM) y bajo (2.5 mM), glutamina (2 mg/ml), histidina (2 mg/ml), arginina (2 mg/ml) y sin N combinado en caja (Tabla 3). Todas crecieron en arginina, glutamina, amonio alto y amonio bajo.

Sensibilidad de Mutantes a MS

En la Figura 3 se muestra la curva de crecimiento de las dos cepas control MX2033 y MX2036 y de las mutantes $Hut^- Nif^-$ así como las MS^S . La tasa de crecimiento de las mutantes $Hut^- Nif^-$ y las mutantes MS^S en ausencia del inhibidor es comparable a la que presentan las cepas control MX2033 y MX2036 en MM adicionado con NH_4Cl 25 mM sin MS. El experimento se realizó en MM líquido adicionado de NH_4^+ (25 mM) en presencia de 50 $\mu g/ml$ de MS. En la figura 3 se puede apreciar el efecto de la MS sobre el crecimiento de las mutantes MS^S , que son inhibidas hasta en un 75% del crecimiento que alcanzan en ausencia de MS, en tanto que las mutantes $Hut^- Nif^-$ y las cepas control bajo las mismas condiciones sólo presentan una inhibición de crecimiento del 50% a las 24 hrs. de incubación. Las mutantes $Hut^- Nif^-$ usadas fueron MX2100, MX2101, MX2102, MX2103 y MX2104 y las MS^S fueron la MX2107, MX2109 y MX2111.

TABLA 1. CEPAS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

Cepa	Cepa Paterna	Fenotipo	Procedencia
<i>Azospirillum brasilense</i>			
Sp7 (ATCC20145)		silvestre	Tarrand et al. '80
MX2088	Sp7	Met ⁻	Loría S., Zamudio M.
MX2100	MX2033	Met ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻	este trabajo
MX2101	MX2033	Met ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻	este trabajo
MX2102	MX2033	Met ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻ Km ^r	este trabajo
MX2103	MX2033	Met ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻ Km ^r	este trabajo
MX2104	MX2033	Met ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻ Km ^r	este trabajo
MX2105	MX2033	Met ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻	este trabajo
MX2106	MX2033	Met ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻	este trabajo
MX2086	Sp7	His ⁻	Loría S., Zamudio M.
MX2107	MX2036	His ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻ Km ^r MS ^s	este trabajo
MX2108	MX2036	His ⁻ Hut ⁻ Nif ⁻ Km ^r MS ^s	este trabajo
MX2109	MX2036	His ⁻ Hut ⁺ Nif ⁺ Km ^r MS ^s	este trabajo
MX2110	MX2036	His ⁻ Hut ⁺ Nif ⁺ Km ^r MS ^s	este trabajo
MX2111	MX2036	His ⁻ Hut ⁺ Nif ⁻ Km ^r MS ^s	este trabajo
MX2112	MX2036	His ⁻ Hut ⁺ Nif ⁻ Km ^r MS ^s	este trabajo
MX2113	MX2102	Met ⁻ Hut ⁺ Nif ^o Km ^r	este trabajo
MX2114	MX2103	Met ⁻ Hut ⁺ Nif ^o Km ^r	este trabajo
MX2115	MX2104	Met ⁻ Hut ⁺ Nif ^o Km ^r	este trabajo
<i>Escherichia coli</i>			
HB101		pro, leu, thi, lacY, hadM, hadR, recA	Ditta et al. '80
GM-4		pro, leu, thi, lacY, recA, rpsL, endA	Ausubel et al. '83
MX918	MX902	glnG::Tn5, pro, thi, ileval, bio, Km ^r	Covarrubias et al. este laboratorio
<hr/>			
Plásmidos	Características importantes		Procedencia
PMC73 A	derivado de PACYC177; contiene 1 fragmento de 2.7 Kb con nifA y extremo 3' de nifL de <i>K. pneumoniae</i> , Km ^r		Cannon et al. '81
PACR3	derivado de PBR327, Ap ^r , contiene la región de glnG de <i>E. coli</i>		Covarrubias et al.
PMM12	derivado de PACYC177, Ap ^r , contiene 1 fragmento de 4.6 Kb con ntrC y 1 pedazo de ntrB de <i>K. pneumoniae</i> .		Merrick et al. '82
PBR322::Tn5	inserción in vivo de Tn5 en PBR322		Espín et al. '84

TABLA 2. CRECIMIENTO DE MUTANTES $Hut^- Nif^-$ EN SUSTRATOS
Ntr EN MEDIO SÓLIDO MM SUPLEMENTADO CON

Cepas	NH ₄ Cl 50 mM	NH ₄ Cl 2.5 mM	Gln †	N ₂	microaero- filia †	His ‡	Arg ‡	Pro ‡	Ala ‡	Ser ‡	Lys ‡	Xan ‡	Urea ‡	NO ₃ 10 mM
MX2093 silvestre	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MX2100 EMS	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MX2101 EMS	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MX2102 Tn ₅	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MX2103 Tn ₅	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MX2104 Tn ₅	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MX2105 NTG	+	±	±	-	-	-	±	±	±					
MX2106 NTG	+	+	+	-	-	-	+	+	+					

† sin nitrógeno compuesto
‡ concentración final 2 mg/ml

+ crecimiento confluyente
± crecimiento residual
- no hay crecimiento

(Los crecimientos se realizaron a 30°C durante un mínimo de 48 hs. y un máximo de 7 días)

Frecuencias de reversión

Fue común observar que los dos fenotipos que se usaron como selectivos ($Hut^- Nif^-$) reversionaban a una frecuencia demasiado elevada aún cuando ésta no se presentó con igual frecuencia para ambos fenotipos, por lo que procedimos a establecer dicha frecuencia para cada marcador. Todas las mutantes, tanto las aisladas por mutagénesis con EMS como las aisladas por inserción de Tn₅, reversionaban a una frecuencia de entre 1×10^{-3} y 5×10^{-4} a un fenotipo $Hut^+ Nif^-$. Esta frecuencia tan alta de reversión a Hut^+ nos sugirió un evento de supresión específica para la utilización de histidina, ya que las mutantes seguían siendo Nif^- .

En *E. coli* han sido descritos eventos de supresión específica a una elevada frecuencia. Vale la pena mencionar el caso de lo que ocurre con mutaciones en el gene *glnF*. Como se mencionó en la introducción, mutaciones en este locus dan por fenotipo una auxotrofia

TABLA 3. CRECIMIENTO DE MUTANTES MS⁸ EN SUSTRATOS Ntr EN SÓLIDO

Cepas	N ₂	NH ₄ Cl 25 mM	NH ₄ Cl 2.5 mM	Gln 2 mg/ml	His 2 mg/ml	Arg 2 mg/ml
MX2086 silvestre	+	+	+	+	+	+
MX2107 Tn5	-	+	+	+	-	+
MX2109 Tn5	+	+	+	+	+	+
MX2111 Tn5	-	+	+	+	+	+

+ crecimiento confluyente
- no hubo crecimiento

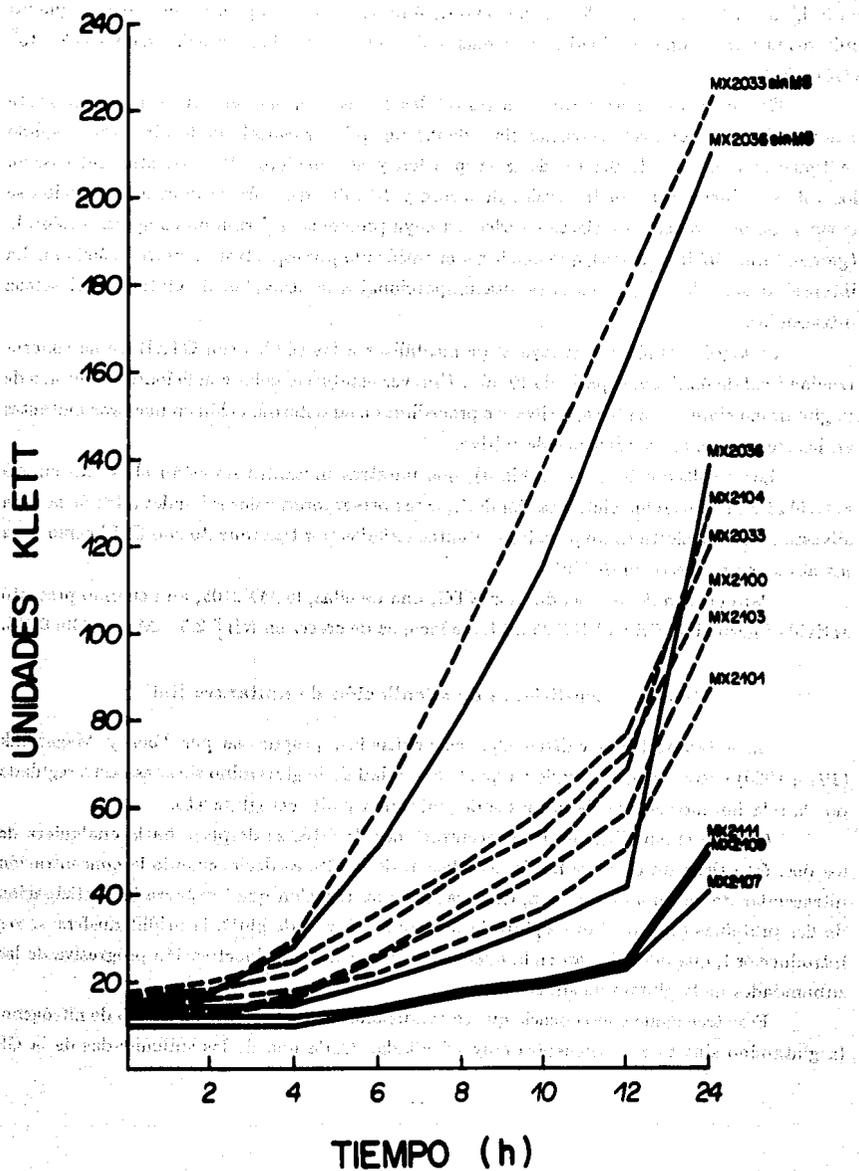
(Las incubaciones se realizaron a 30°C en presencia de O₂ desde 2 hasta 7 días)

por glutamina. Con una frecuencia muy elevada, de alrededor de 1×10^{-4} , se dan eventos de supresión de esta mutación mediante una segunda mutación a un fenotipo Gln⁺. Las mutaciones responsables de la supresión del fenotipo Gln⁻ han sido mapeadas y localizadas dentro de la región estructural para glnG, es decir, que las supresoras específicas de mutaciones en glnF se localizan en glnG, con lo que ahora las mutantes son protótrofas.

De un modo semejante y partiendo de la suposición de que en *A. brasilense* exista el operón para la utilización de histidina en un arreglo físico semejante al de enterobacterias y dado que este fuera activado por el producto de ntrC, pensamos en la posibilidad de que la supresión que encontramos en nuestras mutantes del fenotipo Hut⁻ a Hut⁺ pudiera deberse a un evento específico que diera independencia de dicho activador. Por otro lado, la reversión de Nif⁻ a Nif⁺ es un evento que se presenta a una frecuencia de entre 1×10^{-4} y 1×10^{-5} . Es más frecuente encontrar revertantes Nif⁺ Hut⁺ que Nif⁺ Hut⁻, ya que la reversión a Hut⁺ es 10 veces más frecuente que para el fenotipo Nif⁺.

Estos datos sugieren que posiblemente los eventos mutagénicos se presenten obteniéndose primero una mutación regulatoria que no permitiera activar simultáneamente los operones nif y hut y que mutaciones secundarias e independientes dieran lugar a los fenotipos Nif⁻ Hut⁺ o Nif⁺ Hut⁻ y posteriormente al fenotipo Nif⁺ Hut⁺. Ya que estos eventos se presentan a frecuencias muy elevadas, lo más probable es que se superpongan durante el lapso de los experimentos, de manera que incluso en primoaislamientos ya se logren aislar no sólo Nif⁻ Hut⁻ sino los otros fenotipos Nif⁻ Hut⁺, Nif⁺ Hut⁻, debido a dos eventos mutagénicos independientes y casi simultáneos.

FIG. 3 SENSIBILIDAD DE MUTANTES A 50 μ g/ml DE MS.



Determinaciones de GS de las mutantes *Ensayo de transferasa.*

Lo primero que intentamos fue tratar de establecer las condiciones del ensayo para la cepa silvestre. Para ello crecimos la cepa MX2033 (Met^-) en NH_4^+ 25 mM (exceso de amonio), en NH_4^+ 2.5 mM y en Gln 0.2% (condiciones de limitación de nitrógeno) y permitimos que los cultivos llegaran a una densidad de crecimiento de 100 u. Klett, i.e., aproximadamente 5×10^8 células/ml.

Con objeto de permeabilizar a las células se pusieron en contacto con el detergente aniónico CTAB a una concentración final de 0.1 mg/ml por espacio de 5 min. Acto seguido se tomaron alícuotas de 0.1 ml de la suspensión y se añadieron los sustratos del ensayo; los tubos se incubaron por intervalos de 5 min y 10 min, después de lo cual la reacción se detuvo con una solución de cloruro férrico, en cuya presencia se forma un compuesto colorido (gama-glutamihidroamato), que puede ser cuantificado por espectrofotometría a 560 nm. La intensidad del color desarrollado resulta proporcional a la actividad de glutamino sintetasa intracelular.

Se logró optimizar el ensayo al permeabilizar a las células con CTAB a una concentración final de 0.2% por espacio de 10 min. Una vez establecidas las condiciones del ensayo de la glutamino sintetasa en la cepa silvestre procedimos a su determinación en nuestras mutantes en las tres diferentes condiciones de cultivo.

Los resultados indican (Tabla 4), que nuestras mutantes no están alteradas en sus actividades de glutamino sintetasa. Es decir, éstas presentaron valores iguales a los de la cepa silvestre. Esto es cierto tanto para las mutantes aisladas por tratamiento con EMS como para las aisladas por inserción de Tn5 .

Para el caso de las aisladas por NTG, una de ellas, la MX2105, aún cuando presentó actividad normal de GS en NH_4^+ 25 mM, fue incapaz de crecer en NH_4^+ 2.5 mM o en Gln 0.2%.

Niveles y condiciones de adenilación de mutantes Hut^-

En enterobacterias existen algunas evidencias, propuestas por Foor y Magasanik (1978, 1980) entre otros, que sugieren que la actividad de la glutamino sintetasa está regulada por la relación intracelular de las pozas de glutamina y alfa-cetoglutarato.

Cuando el equilibrio en las concentraciones de éstos se desplaza hacia cualquiera de los dos, éste tiene un efecto sobre la adenilación de la GS; es decir, cuando la concentración intracelular de glutamina aumenta, desencadena una reacción que involucra la participación de dos proteínas (el producto de *ginB*, la proteína PII, y el de *ginD*, la uridiltransferasa, ver introducción), que desembocan en la adenilación y por lo tanto inactivación progresiva de las subunidades de la glutamino sintetasa.

Esto trae como consecuencia que en condiciones de crecimiento en exceso de nitrógeno, la glutamino sintetasa se encuentre muy adenilada. Cada una de las subunidades de la GS

TABLA 4. ACTIVIDAD Y ESTADOS DE ADENILACIÓN DE MUTANTES Hut^-Nif^-

Cepas	Actividad de transferasa			Adenilación \bar{n}		
	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	Gln	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	Gln
	25 mM	2.5 mM	2 mg/ml	25 mM	2.5 mM	2 mg/ml
MX2088	0.57	0.75	1.81	5.16	2.25	1.50
MX2100	0.53	0.73	1.77	5.03	2.07	1.76
MX2101	0.56	0.79	1.57	5.28	2.15	2.25
MX2102	0.57	0.72	1.69	5.14	1.86	1.60
MX2103	0.51	0.77	1.76	4.87	2.43	1.80
MX2104	0.51	0.65	1.63	5.66	2.70	1.71
MX2105	0.76	NC	NC	4.94	NC	NC
MX2106	0.62	1.19	1.77	5.30	2.34	2.16

NC = no creció

\bar{n} = subunidades adeniladas, inactivas

(Las actividades están reportadas como el promedio de los valores obtenidos en tres o más determinaciones realizadas)

tiene una afinidad por sustrato, glutamato más amonio, muy elevada. En condiciones en las que el sustrato no es limitante, basta con que algunas subunidades de la GS estén activas para sintetizar la cantidad de glutamina suficiente para llenar los requerimientos celulares. Por el contrario, cuando las bacterias se cultivan en una fuente limitante de nitrógeno, como sería amonio bajo o glutamina, se encuentra que la glutamino sintetasa está muy desadenilada. Bajo condiciones en las que hay poco amonio, cada subunidad de la GS debe encontrarse en su forma activa para poder captar la mayor cantidad de sustrato posible.

Como ya ha sido reportado por el grupo de Magasanik (Foor *et al.*, 1976, 1980), alteraciones en el sistema de adenilación de la GS, particularmente mutantes en *glnB*, cuya PII no pueda ser uridilada y que por lo tanto se esté favoreciendo la adenilación de la GS, así como mutantes en *glnD* uridiltransferasa, que por ausencia de esta proteína nuevamente no pueda ser modificada la PII, tienen un efecto pleiotrópico sobre la síntesis de *glnA* a través de *ntrC*, que aparentemente no puede ser transformado de represor en activador (según estos autores hay evidencias que sugieren que se requiere de una proteína PII funcional y uridilada para interactuar con *ntrC*), y por lo tanto presentan un fenotipo Ntr^- .

Con objeto de indagar sobre la posibilidad de que nuestras mutantes estuvieran afectadas en el sistema de adenilación, realizamos los ensayos de determinación de la adenilación de la GS en condiciones de exceso de N, en las que la GS se debe encontrar altamente adenilada, así como en condiciones de limitación de N, en las que la GS debe estar en su forma más desadenilada. Como se muestra en la Tabla 4 los valores de adenilación que obtuvimos para

TABLA 5. ACTIVIDAD DE GS Y ADENILACIÓN DE MUTANTES MS^S

Cepas	Actividad de transferasa			Adenilación \bar{n}		
	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	Gln	NH ₄ Cl	NH ₄ Cl	Gln
	25 mM	2.5 mM	2 mg/ml	25 mM	2.5 mM	2 mg/ml
MX2036	0.54	1.15	1.94	4.89	2.12	3.86
MX2107	0.54	1.40	1.03	6.04	1.85	8.10
MX2108	0.52	1.27	0.94	4.38	2.35	9.85
MX2109	0.55	1.24	1.18	5.06	1.85	9.20
MX2110	0.61	1.19	1.01	4.97	2.56	6.76
MX2111	0.52	1.14	1.07	4.42	2.00	9.67
MX2112	0.51	1.38	1.25	3.66	1.94	6.22

\bar{n} = subunidades adeniladas, inactivas

todas nuestras cepas parcialmente alteradas en su regulación por nitrógeno fueron los mismos que para la cepa silvestre en todas las condiciones ensayadas, que fueron NH₄⁺ alto, NH₄⁺ bajo y Gln. La cepa MX2105, (NTG) que no crece en NH₄⁺ bajo ni Gln, presentó actividades y valores de adenilación iguales a los de la cepa silvestre y las demás mutantes en NH₄⁺ alto.

Determinación de GS y grado de adenilación de mutantes MS^S

También se efectuaron las determinaciones de los valores de la glutamino sintetasa y sus estados de adenilación de las mutantes MS^S previamente mencionadas. Los resultados se pueden observar en la Tabla 5. Para estos ensayos la cepa silvestre usada fue la MX2036 (His⁻), de la cual se derivaron estas mutantes. Como se puede notar, las actividades de GS que presentaron tienen valores de represión y de inducción similares a la cepa silvestre en cuanto al ensayo de transferasa se refiere. Sin embargo, todas las mutantes presentaron niveles de adenilación más elevados, exclusivamente en la condición de crecimiento en glutamina, en tanto que los valores fueron normales en condiciones de crecimiento en amonio alto y amonio bajo.

Determinación de glutamato sintasa GOGAT de mutantes Hut⁻ Nif⁻

Ya se ha reportado, (Pahel et al., 1979; Magasanik, 1982), que mutaciones en *gluB*, el gene estructural para la glutamato sintasa de *K. aerogenes*, tienen un efecto pleiotrópico sobre los sistemas Ntr como consecuencia de una acumulación de glutamina y la consiguiente adenilación de la GS, por lo que disminuye la expresión tanto de *glnA* como de *ntrC* (ver introducción). Por esta razón decidimos determinar las actividades de esta enzima. Como puede observarse (Tabla 6), las mutantes Hut⁻ Nif⁻ no resultaron alteradas en esta función;

TABLA 6. ACTIVIDAD DE GOGAT DE MUTANTES Hut⁻Nif⁻ *

Cepas	nmolas de NADH oxidado/min/mg proteína	
MX2088	9.22	
MX2100	11.19	
MX2101	13.78	
MX2102	21.89	(2.38 ×)
MX2103	16.86	(1.83 ×)
MX2104	32.20	(3.5 ×)
MX2105	3.90	
MX2106	8.72	

* todas las determinaciones se realizaron a partir de cultivos adicionados con NH₄Cl 25 mM

sin embargo las mutantes por inserción de Tn5 presentaron actividades entre dos y tres y medio veces más elevadas que la de la cepa silvestre; en tanto que la mutante MX2105 resultó más baja, sólo presenta el 40% de la actividad silvestre.

Presencia en *Azospirillum* de una sólo GS

En vista de que nuestros resultados no concordaban con las características fenotípicas de mutaciones en el locus para ntrC en enterobacterias, se pensó en la posibilidad de que en *A. brasilense* existieran dos glutamino sintetetasas como es el caso de *Rhizobium* (Ludwig 1980) y *Agrobacterium* (Fuchs y Keister, 1980), en cuyo caso la ausencia de actividad de alguna de ellas pudiera verse encubierta por la presencia de una segunda GS cuyas actividades fueran las que estábamos detectando. Para ello decidimos purificar la GS por el método de precipitación con polietilenglicol (Streicher y Tyler, 1980). Una vez precipitada la proteína se resuspendió en buffer de columna (ver material y métodos) y se corrieron geles de desnaturación con SDS en doble dimensión; ésto es, en una primera dimensión por peso molecular y en una segunda dimensión por punto isoeléctrico. Bajo este criterio no encontramos más que la presencia de una sólo GS (estos resultados no se muestran).

Determinación de histidasa de mutantes Hut⁻

Para averiguar si las mutantes con fenotipo Hut⁻ estaban efectivamente alteradas en la utilización de histidina, y más aún, en un locus regulatorio, se decidió determinar la actividad de la enzima histidasa, la primer enzima de la vía del catabolismo de histidina en enterobacterias. Pahel et al. (1982) han observado en *E. coli* una pérdida de inducción de esta vía en mutantes en glnG, por lo que nos interesaba averiguar si es que ésta responde o no en *A. brasilense* a inducción en condiciones de limitación de nitrógeno así como a represión en

condiciones de exceso de nitrógeno, lo que cabría esperar si es que en *Azospirillum* la utilización de histidina y la capacidad de fijar nitrógeno funcionan como un sistema Ntr.

A pesar de haber realizado este ensayo repetidas veces, no se lograron establecer las condiciones del ensayo que resultaran congruentes con una inducción y una represión de la vía correspondientes a la concentración y la fuente de nitrógeno utilizadas para el crecimiento, ya que los valores obtenidos para la silvestre variaron mucho de ensayo en ensayo. Por esta razón, la determinación de esta vía enzimática no resultó beneficiosa para la comprensión de nuestro sistema.

Aislamiento de mutantes revertantes para la fijación de nitrógeno en *A. brasilense*

Partiendo de las mutantes Hut⁻ Nif⁻ obtenidas por mutagénesis con EMS y por Tn₅, se procedió a mutagenizarlas nuevamente con EMS, para buscar revertantes para la fijación de nitrógeno que mantuvieran el fenotipo Hut⁻. Habiendo observado una frecuencia de reversión a Hut⁺ tan alta como quedó mencionado anteriormente, no nos preocupamos demasiado por recuperar mutantes Nif⁺ que necesariamente siguieran siendo Hut⁻, en tanto los otros marcadores utilizados para la identificación de las cepas siguieran siendo detectables. Si nos aseguramos de que aquellas provenientes de inserción por Tn₅ continuaran siendo Km^R. Después del tratamiento con el mutágeno, se les permitió un lapso de recuperación en medio rico, LC, y sin enriquecimiento, se cultivaron directamente en condiciones de microaerofilia sin fuente de N combinado y se dejaron en incubación sin agitación a 30°C hasta que se observó crecimiento. Se colectó el crecimiento, se hicieron diluciones y se volvió a sembrar las bacterias en el mismo medio una vez más sin agitación a 30°C. De aquí se volvieron a hacer diluciones y se espatuló hasta 1×10^{-6} en MM sin N compuesto. Sólo se purificaron las colonias que en caja presentaron un crecimiento más rápido y confluyente que el de la cepa silvestre. Estas cepas se denominaron MX2113, MX2114 y MX2115. Proviene de las cepas MX2100, MX2102 y MX2103 respectivamente, por lo que la MX2114 y MX2115 son Km^R (ver Tabla 1).

Hibridización de DNA total de *A. brasilense* con Tn₅ y pMC78A (nifA)

Con objeto de determinar el número de elementos de transposición presentes en las mutantes, así como su posible ubicación por comparación con las bandas positivas con otros detectores, realizamos experimentos de hibridización tipo Southern. Purificamos el DNA cromosomal de *A. brasilense* por el método reportado por Quiviger *et al.* (1982), con algunas modificaciones (reportadas en Material y Métodos), que nos permitieron limpiar el DNA de un precipitado blanco (posiblemente sean glicocojugados), que impedía la digestión del DNA.

Se purificó el DNA de la cepa silvestre y de las tres mutantes por inserción de Tn₅ Hut⁻ Nif⁻. Los DNA's se digirieron a totalidad y se corrieron los DNA's en geles de electroforesis a 50 volts durante 12 hrs. Como marcador de peso molecular se utilizó el

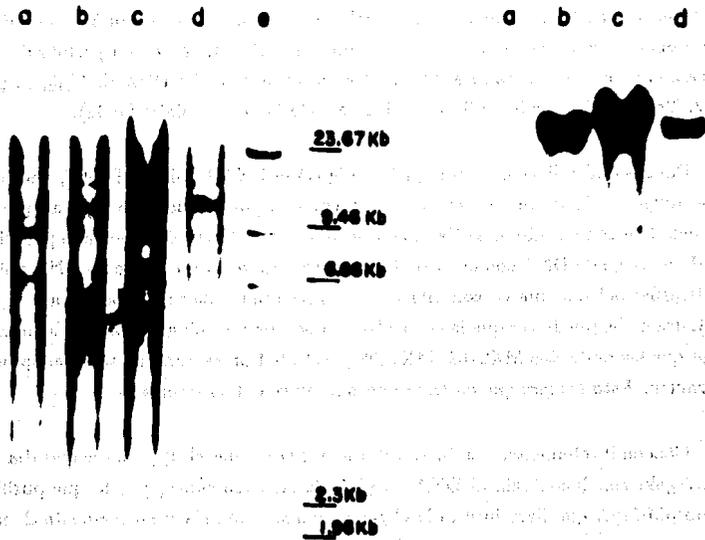
DNA del bacteriófago lambda, digerido con *Hind*III. Estos geles se trataron para su posterior transferencia a papel de nitrocelulosa, mediante desnaturalización alcalina y ácida como lo reporta Southern (1975). En casi todos los experimentos se utilizó la formamida al 40%, lo que permite hibridación entre DNA's que sólo comparten el 70% de su secuencia. Sólomente cuando el detector fue el *Tn5* se usó formamida al 50% ya que este DNA es 100% homólogo al *Tn5* insertado en las mutantes de *A. brasilense*. En general se usaron 5 µg de DNA/carril, excepto donde se especifica que se usó una concentración diferente. La prehibridación y la hibridación se llevaron a cabo a 42°C. Para la obtención del DNA de *Tn5*, se purificó el pBR322::*Tn5* por el método de lisis alcalina reportado por Maniatis (1982).

Para las hibridaciones con *Tn5* se digirió el DNA total con *Eco*RI, pues el *Tn5* no contiene ningún sitio de restricción para esta enzima, por lo que cabe esperar que por cada *Tn5* insertado esté presente una sólo banda positiva. Por el método reportado por Rigby *et al.* (1977) de marcaje de DNA con actividad específica alta mediante el uso de DNA polimerasa I ("nick translation"), se marcó con alfa P³². Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 4. Se puede ver que la cepa silvestre no presenta ninguna banda de hibridación, en tanto que las mutantes MX2102, MX2103 y MX2104 presentan una sólo banda positiva de hibridación. Esto sugiere que en cada una hay un sólo *Tn5* insertado.

Concomitantemente, nos interesaba saber si es que el *Tn5* se encontraba insertado en una región con homología al DNA de *nifA* de *K. pneumoniae*, por lo que purificamos el plásmido pMC73A que lleva insertado el gene completo de *nifA* y un segmento de *nifL*, en el sitio único de restricción de la enzima *Xho*I del vector pACYC177 (Chang y Cohen, 1978). (Tabla 1). Debido al hecho de no contar con la enzima *Xho*I para purificar el fragmento, utilizamos el plásmido completo para la hibridación.

Para este experimento se hibridó primero contra *Tn5*, y luego se dejó decaer la marca por dos semanas, después de lo cual se lavó este mismo filtro en presencia de NaOH 0.2 N durante 20 min. Para asegurarnos de que el filtro estuviera limpio, lo pusimos en contacto con una placa fotográfica que revelamos al par de días. Ya seguros de que el filtro podía volver a utilizarse, se hibridó contra el plásmido pMC73A *nifA*, utilizándose para ello dos millones y medio de cuentas/carril y lavados en SSC hasta 0.5×. De este modo pudimos comparar el tamaño de los fragmentos con hibridación positiva para poder determinar si el *Tn5* se encontraba o no localizado en el mismo fragmento que *nifA*. Como se muestra en la Figura 5, las bandas de hibridación con los detectores no coincidieron. De lo cual se sugiere que el *Tn5* no está insertado en un gene con homología a *nifA* de *K. pneumoniae* si bien esta secuencia sí se encuentra codificada dentro de la información en DNA de *A. brasilense*, ya que encontramos dos bandas de hibridación positiva tanto en la cepa silvestre como en las mutantes cuando se usó el detector que contiene *nifA*.

FIGURA 4: HIBRIDIZACION DE LAS CEPAS MX2033, MX2102, MX2103 y MX2104 vs P⁺ pBR322::In₉.

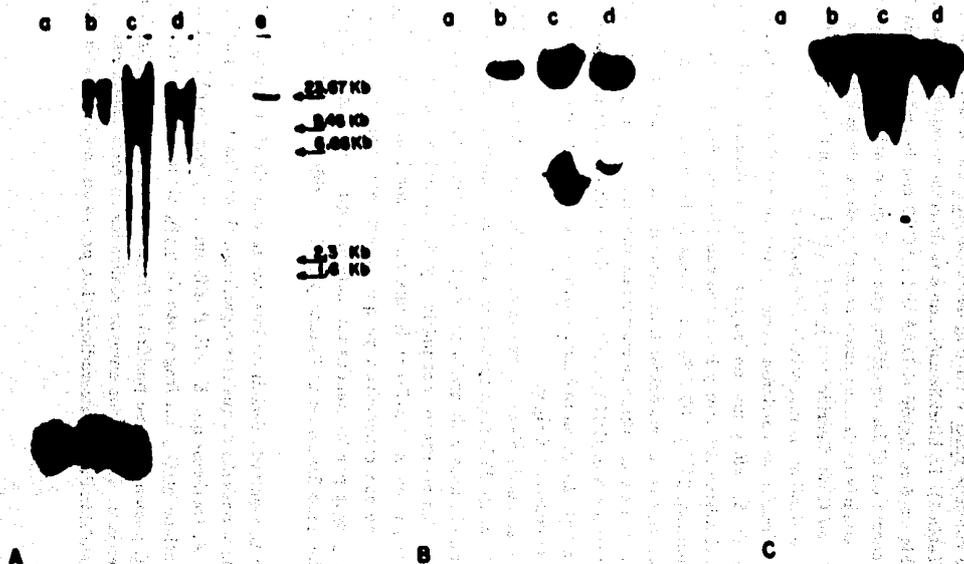


A

B

En el panel A se muestra el patrón electroforético de los DNAs de las cepas a) MX2033 b) MX2102 c) MX2103 d) MX2104 digeridos con EcoRI e) λ /HindIII teñidos con bromuro de etidio. Las flechas indican los pesos moleculares de las bandas de λ /HindIII. En el panel B se muestra la hibridización con P⁺ pBR322::In₉. a) MX2033 b) MX2102 c) MX2103 d) MX2104. La cepa silvestre MX2033 no presenta ninguna banda positiva de hibridización.

FIGURA 5: HIBRIDIZACION DE LAS CEPAS MX2033, MX2102, MX2103 y MX2104 vs p⁺ pMC73A y p⁺ pBR322::In_S



Los carriles a-e) contienen el DNA de las siguientes cepas: a) MX2033 b) MX2102 c) MX2103 d) MX2104 digeridos con EcoRI. e) λ HindIII. En el panel A se muestra el patrón electroforético de las cepas a-e) teñidas con bromuro de etidio. Las flechas indican los pesos moleculares de las bandas del DNA de λ digerido con HindIII. En el panel B se muestra la hibridización de las cepas a-d) vs p⁺ pMC73A (p116 y p117). Todas las cepas presentan una banda de hibridación positiva.

El panel C muestra la hibridización del mismo filtro usado en el panel B vs p⁺ pBR322::In_S de las cepas a-d). La cepa silvestre MX2033 no presenta banda alguna de hibridación. Se puede observar que los pesos moleculares de las bandas positivas no coinciden con las bandas en el panel B.

Hibridación con *ntrC* de *E. coli*

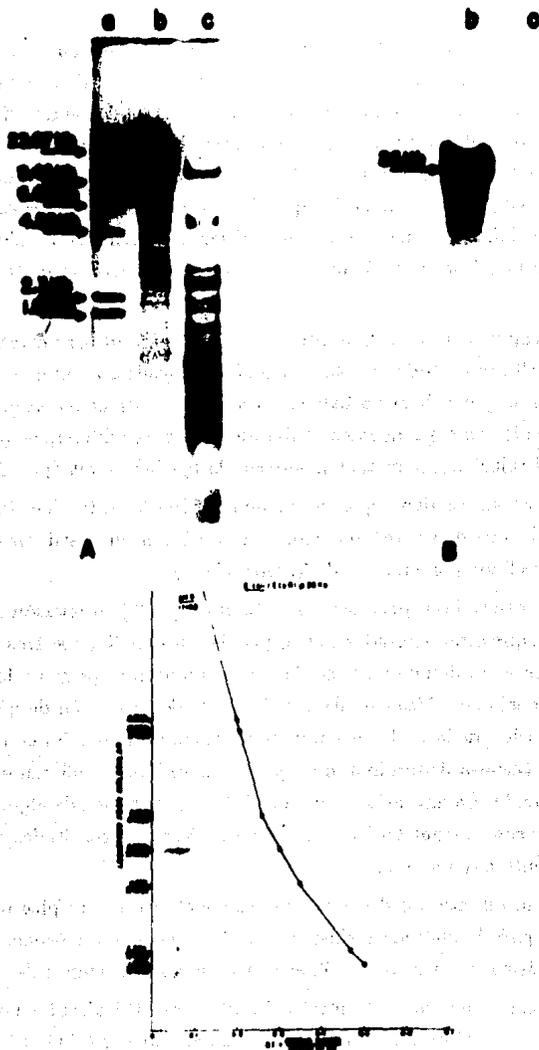
Uno de los objetivos fundamentales que nos planteamos fue el de discernir si es que en *A. brasilense* existe un locus con homología para *ntrC*. Para ello purificamos el plásmido pACR3, que contiene *glnG* y un fragmento de *glnL* de *E. coli* (construido por la Dra. A. Covarrubias, Tabla 1). La hibridación con este detector se repitió varias veces. Para el experimento de la Figura 6 se digirió el DNA del pACR3 con la endonucleasa *Hin*II y se purificó el fragmento cuarto de dicha digestión, que es el que contiene la casi totalidad del gene *glnG* en 800 pb. Además utilizamos como control positivo de la hibridación el DNA total de la cepa de *E. coli* GM4 digerido con *Eco*RI. *glnG* no contiene sitios de restricción para *Eco*RI, por lo que esperábamos una sólo banda positiva.

Para este experimento se corrieron varios pares de carriles conteniendo el control positivo, la cepa GM4 de *E. coli*, y una de las mutantes, la MX2103. Esto se hizo con el objeto de probar para el mismo detector y la misma cantidad de marca/carril, una diferente concentración de formamida, 25% y 40%. Se utilizó una de las mutantes con el propósito de poder reutilizar el filtro en caso de encontrar hibridación positiva, para rehibridar contra *Tn5* y así establecer si es que este último se encontrase insertado en un gene con homología a *glnG* de *E. coli*. Se utilizaron 5 µg/DNA/carril y 5 millones de cuentas/carril. Los lavados se realizaron sólo en SSC 2x durante 4 hrs. hasta que en el filtro no se detectaron cuentas de radioactividad con el contador Geiger.

En la Figura 6 se puede observar que la cepa GM4 da una banda positiva clara de hibridación, de alrededor de 26 Kb, en tanto que la MX2103 no presentó banda alguna aún cuando se dejó revelando la autorradiografía por espacio de dos semanas. Preliminarmente este resultado aunado a los resultados enzimáticos y de crecimiento de nuestras mutantes, nos sugieren la inexistencia en *A. brasilense* de una región con homología a *glnG*. Sin embargo, estos resultados no son conclusivos, ya que en este experimento se enriqueció para DNA de plásmidos, a juzgar por las bandas tan definidas que aparecen en el gel con EtBr, y considerando que las modificaciones utilizadas para la purificación del DNA incluyen el calentamiento a 70°C.

En vista de este resultado decidimos intentar la hibridación con *ntrC* de *K. pneumoniae*, partiendo de la suposición de que este organismo, al ser diazotrófico, pudiera presentar mayor homología con *A. brasilense* que *E. coli*. Purificamos el plásmido pMM12, derivado del pGE100, que sólo contiene *ntrC* y un fragmento de *ntrB*, clonados como un fragmento de *Sma*I de 4.6 Kb de *K. pneumoniae*. Se purificó el fragmento de 4.6 Kb de *Sma*I, mismo que fue utilizado como detector. En los dos ensayos realizados en estas condiciones, no se logró obtener una buena definición de las autorradiografías, por lo que no fue posible obtener datos conclusivos.

FIGURA 6: HIBRIDIZACION DE LAS CEPAS MX2103 Y GM4 vs *peso gloB* de *E. coli*.



El panel A representa el patrón de digestión y la tinción con bromuro de etidio de las cepas a) λ /HindIII b) GM4/EcoRI c) MX2103/EcoRI. El panel B muestra la hibridación de las cepas b) GM4 y c) MX2103 vs *peso gloB* (fragmento 4° del pACR3/BioII) de *E. coli*. Se puede observar una banda positiva en GM4, en tanto la MX2103 no presenta ninguna banda. La flecha indica el peso molecular aproximado de la banda positiva en GM4.

El panel C presenta la curva del logaritmo de los pesos moleculares de las bandas de λ /HindIII, y el cálculo aproximado del peso molecular de la banda de hibridación en GM4.

Discusión

En este trabajo se describe el aislamiento de mutantes que simultáneamente a la pérdida de la capacidad para fijar nitrógeno pierden la de utilizar histidina como fuente única de nitrógeno. No obstante los diversos intentos por obtener mutantes que estuvieran alteradas en los sistemas Ntr de un modo más general, las mutantes obtenidas por diversos métodos de mutagénesis y de selección, presentaron invariablemente un fenotipo concomitante $Hut^- Nif^-$, y no uno más amplio Ntr, definido como incapacidad de utilizar otras fuentes alternas de nitrógeno tales como arginina, prolina, alanina, etc. Cuando se utilizaron aminoácidos como arginina o prolina para la selección de fenotipo Nif^- , no se encontraron mutantes con estas características.

Al analizar la capacidad de las mutantes $Hut^- Nif^-$ para utilizar diversas fuentes de N, se encontró que crecieron en todos los sustratos Ntr ensayados, a excepción de histidina (Tabla 2). Es interesante que si bien no hallamos un sistema Ntr como en enterobacterias, nuestras mutantes, aisladas en experimentos utilizando mutágenos diferentes, presentaron un fenotipo doble que está relacionado aparentemente con la fijación de nitrógeno.

Por otra parte es sorprendente que en ninguna de ellas la glutamino sintetasa resultó alterada en su actividad en las diferentes condiciones ensayadas, ni en su sistema de adenilación cuando se compara con el comportamiento de la cepa silvestre.

A la luz de los resultados reportados por Jara *et al.* (1983) en relación a las mutantes en *glnA* de *A. brasilense* que están alteradas en la capacidad de fijar N_2 , nuestros resultados nos llamaron la atención, en vista de que ninguna de nuestras mutantes presentó la GS alterada. Por otra parte, la presencia en *Rhizobium* de dos GS's y la demostración de que alteraciones en el sistema de adenilación de la GSI causa una incapacidad para fijar N_2 en este organismo (Ludwig, 1980), nos llevaron a determinar si es que en *Azospirillum* pudieran existir también dos GS's, y que ésto encubriera alteraciones en la actividad enzimática de alguna de ellas que pudiera correlacionarse con el fenotipo Nif^- encontrado. Nuestros resultados apuntan a que en *A. brasilense* solamente hay una GS.

Asimismo, en un intento por delindar un posible efecto pleiotrópico por mutaciones en el gene que codifica para la glutamato sintasa sobre la fijación de nitrógeno, realizamos las determinaciones enzimáticas para la GOGAT, encontrándonos tres grupos de mutantes.

El primero lo componen las mutantes MX2100 y MX2101 aisladas por EMS. Estas presentan actividades comparables a la de la silvestre. La mutante por NTG MX2106 pertenece a este grupo.

El segundo grupo está formado por las cepas MX2102, MX2103 y MX2104, cuyas actividades de GOGAT son de entre 200% y 350% las de la actividad silvestre.

La tercer categoría la forma la mutante por NTG MX2105, que presenta solamente el 40% de la actividad presente en la silvestre.

En nuestro laboratorio se han encontrado evidencias que apuntan a que en *E. coli* existe un locus regulatorio contiguo a los genes estructurales para la glutamato sintasa. Este locus regulatorio está aparentemente relacionado con la expresión de ciertos sistemas Ntr.

Estos resultados, fundamentados en la tesis de Maestría de Irene Castaño, sugieren la existencia de otro(s) gene(s), además de glnG, que interviene(n) o participa(n) en el encendido de los operones sujetos a una regulación Ntr, que de manera quizá menos general que el regulador glnG, juegan un papel en esta regulación.

Si consideramos, de modo muy general, que las vías fundamentales de asimilación de NH_4^+ en la célula son la GS-GOGAT y la GDH, y que muy relacionado a la GS se encuentra el regulador general (en *K. pneumoniae*, *E. coli*, *K. aerogenes*) de los sistemas Ntr, glnG, podemos encontrar algunas semejanzas interesantes respecto a los reguladores en cada vía. Por ej.: la fijación de N_2 , como otra vía importante de asimilación de nitrógeno, requiere de nifA para activar la transcripción, y nifA es un gene tipo ntrC, tanto por su función como por la secuencia de promotor que reconoce, i.e. es un regulador que requiere de ser regulado.

Ya hace tiempo se viene asociando un fenotipo Ntr a mutaciones en GOGAT. Experimentos recientes en *E. coli* sugieren que contiguo a los genes estructurales para la GOGAT se encuentra codificado un regulador "tipo glnG", ya que se requiere para que la cepa sea Aut^+ . Por otra parte, Garcíarrubio *et al.* (1983), han sugerido que en la región de GOGAT existen dos promotores funcionales.

En este trabajo se ha presentado el aislamiento de mutantes alteradas en alguno(s) sistema(s) Ntr en *A. brasilense*, cuyas GS no se encuentran afectadas, pero cuyas GOGAT sí presentan alteraciones.

Si suponemos que los diferentes organismos presentan las principales vías del metabolismo de nitrógeno, pero que la regulación de éstas o por éstas del consumo de nitrógeno varía o puede variar según la estrategia evolutiva y adaptativa de cada organismo, entonces es posible suponer que en *A. brasilense* pueda existir un regulador del "tipo ntrC", asociado a GOGAT, cuyo efecto solamente se viera relacionado a la utilización de histidina y a la fijación de N_2 .

Para explicar nuestros datos tendríamos que suponer que por una mutación puntual en el regulador, se podría alterar su función sobre los sistemas "Ntr", sin que ésto afectara la actividad de GOGAT (MX2100 y MX2101).

Por otra parte, podemos pensar también que el Tn5 insertado en el segundo grupo de mutantes pudiera interrumpir el gene regulador afectándolo de tal modo que ya no pueda ejercer un papel de represor (Castaño, 1986) o regulador sobre la transcripción de los genes para GOGAT, con lo que éstos se transcribirían con mayor eficiencia que la normal, lo cual resultaría en una elevación de la actividad de GOGAT, (MX2102, MX2103 y MX2104).

Finalmente cabe esperar también la generación de un promotor "down" por múltiples mutaciones con NTG y la consiguiente disminución de la GOGAT, o aún, la generación de mutaciones que alteren directamente la GOGAT, de modo tal que su afinidad por sustrato o el sitio activo quede modificado. Ya que se ha aislado la mutante MX2105, que presenta una baja actividad de GOGAT y dificultades para crecer en condiciones de limitación de nitrógeno, el estudio de la asimilación de NH_4^+ y la síntesis de GDH en esta cepa podrían permitir un mejor análisis de la aportación de la vía GDH vs. GS-GOGAT en este organismo.

Por otra parte, insistimos en hallar una correlación entre la sensibilidad a MS y la asimilación de nitrógeno. Para ello obtuvimos mutantes MS^{S} por inserción de Tn5 , que presentaron tres fenotipos respecto a la asimilación de N: a) $\text{Hut}^- \text{Nif}^-$, b) $\text{Hut}^+ \text{Nif}^-$, c) $\text{Hut}^+ \text{Nif}^+$. Al analizar su comportamiento respecto a la GS encontramos que presentan valores normales en todas las condiciones, pero que indistintamente de si son Hut^+ o Hut^- y de si son Nif^+ o Nif^- , todas se encontraron muy adeniladas sólo cuando las determinaciones enzimáticas se efectuaron en cultivos crecidos en glutamina como única fuente de N (Tabla 5). Cabe hacer notar que las actividades de GS detectadas en *A. brasilense* en condiciones de inducción (glutamina 2 mg/ml) son apenas 3 veces las detectadas en condiciones de represión (NH_4Cl 25 mM), en tanto que en *E. coli*, los valores de inducción son del orden de 10 o más veces los valores de represión.

Resulta pues interesante que en *A. brasilense* las mutaciones MS^{S} afectan fundamentalmente la adenilación de la GS en presencia de glutamina y no en presencia de otras fuentes de N, por lo que cabe sugerir que posiblemente estén afectadas en el sistema de transporte de glutamina. A diferencia de lo que sucede en *E. coli* donde la glutamina funciona como una fuente limitante de N (lo que da lugar a elevados niveles de actividad de GS desadenilada), en las mutantes MS^{S} de *A. brasilense* parecería que dichas mutaciones permiten una mayor entrada de glutamina, lo cual trae como consecuencia relativa represión de la síntesis de GS y mucho mayor adenilación. Asimismo, por la misma vía entraría la metionina sulfoximina, lo cual explicaría porqué estas mutantes son más sensibles a este compuesto.

En *R. phaseoli*, Morett (1984) ha observado que mutaciones MS^{S} (aisladas por inserción de Tn5) presentan tres fenotipos distinguibles. Pueden presentar alteraciones en una o en ambas GS's, GSI y GSII, y ésto puede estar correlacionado aunque no necesariamente, a una alteración en la capacidad de fijar N_2 y/o en la nodulación. Una de sus mutantes (cromosomales) no fija nitrógeno molecular y presenta dificultades para nodular en su huésped natural. Esta mutante es asimismo la que presenta los valores más bajos de actividad de las dos GS's. En el laboratorio de G. Espín (1984) clonaron esta mutación hibridando el DNA de esa cepa contra DNA de Tn5 y aislando el fragmento que da hibridación positiva. Luego utilizaron este fragmento para obtener la región silvestre de esta mutación por hibridación contra un banco de genes de *R. phaseoli*. Una vez teniendo el fragmento que contiene la región silvestre de la mutación MS^{S} , lo utilizaron para hibridar contra DNA total y DNA de plásmidos de la cepa silvestre de *R. phaseoli* CFN42.

Encuentran algo muy interesante y es que éste hibridiza contra DNA cromosomal, así como también contra DNA de plásmidos, en particular contra el plásmido SIM, que es el que contiene la información para los genes estructurales para la nitrogenasa así como por lo menos un gene regulatorio "tipo *nifA*" y la información para los genes de la nodulación. Cuando utilizan como detector de hibridización el gene *ntrC* de *K. pneumoniae* contra el DNA total y DNA de plásmidos de la cepa de *Rhizobium* CFN42, encuentran una banda positiva en cromosoma, y una banda en el plásmido SIM. Sin embargo, estas bandas de hibridización no coinciden en peso molecular, ni en cromosoma ni en plásmido, con las bandas positivas obtenidas contra la región silvestre de la mutación *MS^S*, por lo que ésta no se localiza en un gene con homología a *ntrC*. Sin embargo, no queda descartada la posibilidad de que se localicen en un gene "tipo *ntrC*" por cuanto a su función se refiere.

A la luz de estos resultados en *Rhizobium* y los resultados mencionados en *A. brasilense*, propulimos las siguientes consideraciones:

- 1.- De existir *ntrC* en *A. brasilense* (cosa que no ha sido demostrada), éste sólo controla la regulación de la GS y no la utilización de otros sustratos nitrogenados. De no existir *ntrC*, la regulación de la GS se daría a través del sistema de adenilación y/o por algún otro mecanismo.
- 2.- Nuestros resultados indican que existe un regulador en *A. brasilense* que controla simultáneamente la utilización de histidina y la fijación de N_2 , el cual no ejerce ningún efecto sobre la regulación de *glnA*.

Con objeto de establecer la existencia o inexistencia de una región homóloga a *ntrC* realizamos experimentos de hibridización DNA-DNA, entre DNA total de *A. brasilense* y *glnG* de *E. coli*. Bajo las condiciones que utilizamos no detectamos ninguna banda de hibridización positiva. Posteriormente repetimos el experimento utilizando esta vez *ntrC* de *K. pneumoniae*. Aquí los resultados no fueron claros, por lo que es necesario repetir este experimento. Sin embargo, nuestros datos fisiológicos y el resultado obtenido de la hibridización de DNA de *A. brasilense* contra DNA conteniendo *glnG* (*ntrC*) de *E. coli*, apuntan a que en *A. brasilense* no está presente un locus con homología y funciones similares a *glnG* (*ntrC*) de enterobacterias.

Por otra parte, las hibridizaciones realizadas entre DNA total de *A. brasilense* y DNA de *Tn5* sugieren que en nuestras mutantes solamente se encuentra presente una copia de este transposón, y en vista de que en diferentes eventos mutagénicos el fenotipo obtenido se repitió recuperándose simultáneamente mutantes $Hut^- Nif^-$ con características enzimáticas semejantes entre sí, queda sugerido que basta la presencia de un sólo *Tn5* para explicar el fenotipo observado.

Los resultados de este trabajo referentes a *ntrC* (*glnG*) parecen estar apoyados por un trabajo realizado en *A. brasilense* por Pedrosa y Yates (1984). Ellos aíslan mutantes alteradas en su capacidad de fijar N_2 . Entre ellas, la FP8 y la FP9, crecen en todos los sustratos Ntr (NH_4Cl 1 mM, NH_4Cl 20 mM, arginina, prolina, histidina y ácido glutámico), excepto en NO_3 . Pedrosa y Yates (1984) mencionan que estas dos mutantes presentan solamente un

30% de la actividad de GS que la de la cepa silvestre (es decir, que la GS de sus mutantes se comporta como la de cualquier mutante *ntrC* de enterobacterias). Realizan experimentos de complementación por conjugación con plásmidos del grupo de incompatibilidad IncP e introducen tanto *nifA* como *ntrC*. Utilizan el plásmido pCK3 (*nifA*^C que se expresa de forma constitutiva a partir del promotor de tetraciclina), y encuentran que este plásmido es capaz de complementar ambas mutaciones restableciéndoles la capacidad para fijar N₂. Por otra parte introducen el plásmido pGE10 (*glnAntrBC* de *K. pneumoniae* construido por G. Espín), y en este caso, el pGE10 no es capaz de restituir la función de fijación de N₂ a sus mutantes.

Es interesante notar que sus mutantes no están alteradas en su capacidad para utilizar los sustratos Ntr incluyendo la histidina, en cambio no crecen en NO₃. Los datos de este trabajo de tesis difieren de los del trabajo de Pedrosa y Yates en que nuestras mutantes sí crecen en NO₃ y no crecen en histidina, y no presentan alteraciones en el comportamiento de la GS.

Cabe mencionar también que en *A. vinelandii* se han encontrado resultados que sugieren que en este organismo tampoco funciona como regulador general el producto de *ntrC*. Kennedy C. (1985) realizó experimentos de complementación con mutantes regulatorias alteradas en la fijación de N₂. Estas fueron complementadas para Nif⁺ por el pCK3 (*nifA*^C de *K. pneumoniae*). En cambio cuando se introduce el plásmido pMD45 (*ntrC* de *K. pneumoniae*) no se restablece el fenotipo Nif⁺. Por otra parte, el pMD132 (*nifL* de *K. pneumoniae* que se expresa constitutivamente), cuando se introduce en la cepa silvestre de *A. vinelandii* no interfiere con los niveles de fijación de N₂ en absoluto. En cambio, cuando el pMD132 se introduce en la mutante Nif⁻ simultáneamente con el pCK3, interfiere e impide que esta cepa recupere el fenotipo Nif⁺. Cuando introdujo *nifH-lacZ* de *K. pneumoniae* en *A. vinelandii* encontró una ausencia total de la expresión de *nifH* a juzgar por la actividad de beta-galactosidasa. En cambio la inversa, es decir, *nifH* de *A. vinelandii* clonado en *K. pneumoniae* redujo notablemente la actividad de nitrogenasa de la cepa silvestre de *K. pneumoniae*, lo cual indica una fuerte interacción entre el promotor de *nifH* de *A. vinelandii* y el producto de *nifA* de *K. pneumoniae*. Asimismo sugiere que en *A. vinelandii*, a semejanza de lo que ocurre en *A. brasilense*, el producto de *ntrC*, por lo menos el de *K. pneumoniae*, no es capaz de activar la transcripción de la nitrogenasa en tanto que el producto de *nifA* de *K. pneumoniae* sí logra hacerlo en las mutantes Nif⁻.

Ausubel (1983), Merrick (1983) y Drummond (1983) han profundizado en el estudio de los productos de *ntrC* y *nifA*, sus blancos de acción a nivel de DNA y las estructuras que reconocen. Ya sabiendo que ambos productos génicos cumplen funciones semejantes relacionadas a metabolismo nitrogenado, iniciaron estudios comparativos de las secuencias que reconocen en los promotores de los genes que regulan. Comparando las secuencias de varios promotores como son el de *glnA* de *E. coli*, los de transporte de histidina y arginina de *S. typhimurium*, *nifH* de *R. meliloti*, *nifH*, *nifL*, *nifE*, *nifM*, *nifY* y *nifB* de *K. pneumoniae*, han identificado una secuencia heptamérica consenso entre todos estos promotores, en la región del

-10 a -35, pero diferente a la secuencia consenso de promotor encontrada para *E. coli* (Beynon et al., 1983). Esta es TTTTGCA para aquellos operones activables tanto por ntrC como por nifA. (Ya se mencionó en la introducción que el producto de nifA puede sustituir al de ntrC como activador). En cambio, los operones que sólo pueden ser activados por nifA, comparten solamente una secuencia de 5 pb consenso, que es TTGCA.

Independientemente, Merrick y Drummond (1983), así como Ausubel y Ow (1983), han encontrado que el producto de nifA, cuando se expresa a partir de un promotor constitutivo, puede sustituir al producto de ntrC como activador de los operones normalmente regulados por ntrC. Ow y Ausubel (1983a) han propuesto incluso, que aún en condiciones fisiológicas, una vez activada la transcripción de nifA, éste pudiera activar el promotor de glnA para asegurar a través de la GS, un flujo continuo de NH_4^+ hacia glutamina que mantenga la concentración intracelular de NH_4^+ tan baja que la síntesis de nitrogenasa no se vea reprimida.

En *Anabaena sp.*, Tumer (1983) encontró que hay homología entre el DNA total de esta cianobacteria y los genes estructurales de la nitrogenasa nifHDK de *K. pneumoniae*. Este autor tampoco encontró un control nitrogenado del tipo Ntr en *Anabaena sp.*. En completa congruencia, Tumer (1983) encontró que el gene de glnA de *Anabaena* clonado en *E. coli* se expresa independiente de ntrC. En este mismo trabajo se mapeó la región de iniciación de la transcripción de glnA, y se encontraron dos sitios de iniciación. Uno de ellos tiene una secuencia similar al promotor consenso de *E. coli* y es el que se usa en condiciones de exceso de nitrógeno. El segundo presenta una secuencia semejante al promotor de nifH de *Anabaena*, y es éste el que se usa en condiciones de limitación de nitrógeno.

Así, por una parte las semejanzas entre los operones ntrBC y nifLA han llevado a varios grupos a proponer un origen común para ambos, que nifLA surge como una duplicación de ntrBC, con su posterior especialización (Ow y Ausubel 1983a). Por otra parte, la información que se ha venido acumulando alrededor de estos dos operones en diferentes organismos diazotróficos, apunta a que si bien los genes estructurales para la fijación de N_2 están muy conservados a nivel de la secuencia así como el gene nifA, los mecanismos de regulación que controlan esta función no se encuentran tan conservados. Así, en *A. vinelandii*, en *R. phaseoli*, en *Anabaena sp.* y en *A. brasilense* pareciera que el control para la fijación de nitrógeno prescinde de ntrC y en cambio se regula por el sistema de adenilación de la GS y por un activador del tipo de nifA.

Asimismo, nuestros datos sugieren la existencia de un regulador adicional para Nif y Hut el cual no parece ser ntrC; hasta el momento ntrC no ha sido identificado a nivel molecular. El hecho observado de que el producto de ntrC y el de nifA presenten similitudes funcionales y de que sus respectivos genes compartan cierto grado de homología a nivel de secuencia, podría sugerir que en nuestras mutantes, mutaciones en nifA pudieran ser responsables de los fenotipos $\text{Nif}^- \text{Hut}^-$. Sin embargo, al realizar experimentos de hibridación entre DNA total de *A. brasilense* y DNA con nifA de *K. pneumoniae*, encontramos que si bien hay dos bandas de hibridación positiva con nifA, ninguna de las dos correspondió en peso molecular a la

que contenía el **Tn5**. Este resultado apoya la suposición de que el **Tn5** en las mutantes de *A. brasiliense* no se localiza en el gene de **nifA**.

A la luz del reciente modelo en *E. coli* de un posible regulador en la región de GOGAT, resultaría interesante analizar por hibridizaciones, si es que las mutaciones responsables del fenotipo **Hut⁻ Nif⁻** están localizadas en la región contigua a los genes estructurales para GOGAT.

Resulta conveniente enfatizar que los estudios que se realicen sobre estructura y función génica en *A. brasiliense* se ven impedidos hasta el momento por nuestra incapacidad en haber generado un sistema de recombinación génica en este organismo. Por consiguiente, estudios de alelismo, de mapeo genético, las relaciones de ligamiento y los estudios de complementación se ven supeditados al empleo de plásmidos promiscuos para poder introducir información genética en estas células. El desarrollo de un sistema de recombinación génica es de suma importancia si queremos llegar a conclusiones más específicas y menos elucubrativas como a las que hemos tenido que recurrir hasta el momento, tanto nosotros como otros investigadores que trabajan con esta bacteria.

Bibliografía

- Alvares-Morales, A., Dixon, R. y Merrick, M. (1984). Positive and negative control of the *glnAntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO J.* **3**: 501-507.
- Ausubel, F.M., Riedel, G., Cannon, F., Peskin, A. y Margolke, R. (1977). Cloning nitrogen fixing genes from *Klebsiella pneumoniae* *in vitro* and the isolation of *nif* promoter mutants affecting glutamine synthetase regulation. En Genetic engineering for nitrogen fixation (basic life sciences), ed. Hollaender, A. Vol. **2**: 111-128.
- Ausubel, F.M., Bird, S.C., Durbin, K.J., Janssen, K.A., Margolke, R.F. y Peskin, A.P. (1979). Glutamine synthetase mutations which affect expression of nitrogen fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **142**: 597-606.
- Backman, K., Chen, Y.M. y Magasanik, B. (1981). Physical and genetic characterization of the *glnA-glnG* region of *Escherichia coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **78**: 3473-3547.
- Baldani, V.L.D. y Dobreiner, J. (1980). Host plant specificity in the infection of cereals with *Asospirillum spp.* *Soil Biol. Biochem.* **12**: 434-444.
- Banfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncs, C., Kiss, A., Dusha, I. y Kondorosi, A. (1981). Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 318-325. Citado por Elmerich, C. (1984). *Bio/Technology* noviembre.
- Bani, D., Barberio, C., Bassicalupo, M., Favilli, F., Gallori, E. y Polsinelli, M. (1980). Isolation and characterization of glutamate synthase mutants of *Asospirillum brasiliense*. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 239-244.
- Bender, R.A. y Magasanik, B. (1977a). Regulatory mutations in the *Klebsiella aerogenes* structural gene for glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* **132**: 100-105.
- Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnik, A.D., Blumenberg, M., Foor, F. y Magasanik, B. (1977b). Biochemical parameters of glutamine synthetase of *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **129**: 1001-1009.
- Berlinger, J.D., Brewin, N., Johnston, A.B.W., Schulman, H.K. y Hopwood, D.A. (1979). The *Rhizobium-legume* symbiosis. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **204**: 219-233.
- Beynon, J.L., Berlinger, J.E. y Johnston, A.W.B. (1980). Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 421-429. Citado por Elmerich, C. (1984). *Bio/Technology*, noviembre.
- Beynon, J., Cannon, M., Buchanan-Wollaston, V. y Cannon, F. (1983). The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell* **34**: 665-671.
- Brenchley, J.E., Baker, C.A. y Patil, L.G. (1975). Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **124**: 182-189.
- Brill, W.J., Steiner, A.L. y Shah, V.K. (1974). Effect of molybdenum starvation and tungsten on the synthesis of nitrogenase components in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **118**: 986-989.
- Brill, W.J. (1975). Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* **29**: 109-129.

- Brown, S.E. y Ausubel, F.M. (1984). Mutations affecting regulation of the *Klebsiella pneumoniae* *nifH* (nitrogenase reductase) promoter. *J. Bacteriol.* **157**: 143-147.
- Buchanan-Wollaston, V., Cannon, M.C. y Cannon, F.C. (1981). The use of cloned *nif* nitrogen fixation DNA to investigate transcriptional regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **184**: 102-106.
- Buchanan-Wollaston, V., Cannon, M.C., Beynon, J.L. y Cannon, F.C. (1981). Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* **294**: 776-778.
- Castaño, I. y Bastarrachea, F. (1984). *glnF-lacZ* fusions in *Escherichia coli*: studies on *glnF* expression and its chromosomal orientation. *Mol. Gen. Genet.* **195**: 228-233.
- Castaño, I. (1986). Tesis de Maestría en IBB.
- Chang, A.C.Y. y Cohen, S.N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmids. *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1150.
- Covarrubias, A.A. y Bastarrachea, F. (1983). Nucleotide sequence of the *glnA* control region of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 171-175.
- Darrow, R.A. y Knotta, R.R. (1977). Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **78**: 554-559.
- Darrow, R.A. (1980). Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. En *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation*. Mora, J. and Palacios, R. (eds.) Academic Press Nueva York. pp. 136-139.
- deBruijn, F.J. y Ausubel F.M. (1983). The cloning and characterization of the *glnF* (*ntrA*) gene of *Klebsiella pneumoniae*: role of *glnF* (*ntrA*) in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilation genes. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 342-353.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helsinki, D. (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.
- Dixon, R., Kennedy, C., Kondorosi, A., Krishnapillai, V. y Merrick, M. (1977). Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants. *Mol. Gen. Genet.* **157**: 189-198.
- Dixon, R., Eady, R., Espín, G., Hill, S., Iaccarino, M., Kahn, D. y Merrick, M. (1980). Analysis of regulation of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation *nif* gene cluster, with *nif* fusions. *Nature* **286**: 128-132.
- Dixon, R., Kennedy, C. y Merrick, M. (1981). Genetic control of nitrogen fixation. En *Genetics as a tool in microbiology*, Symposium of the Society for General Microbiology No. 31. Ed. Glover and Hopward. Cambridge University Press.
- Dixon, R., Alvarez-Morales, A., Clements, J., Drummond, M., Merrick, M. y Postgate, J.R. (1984). Transcriptional control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. En *Advances in nitrogen fixation research*. Veeger, C. and Newton, W.E. (eds.). The Hague Nijhoff / Junk Pudoc pp. 635-642.
- Drummond, M., Clements, J., Merrick, M. y Dixon, R. (1983). Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* **301**: 302-307.
- Eady, R.R., Smith, B.E., Cook, K.A. y Postgate, J.R. (1972). Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.* **124**: 655-675.

- Elmerich, C., Quiviger, B., Rosenberg, Ch., Franche, C., Laurent, P. y Dobreiner, J. (1982). Characterization of a temperate bacteriophage for *Azospirillum brasilense*. *Virology* **122**: 29-37.
- Elmerich, C. (1984). Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. *Bio/Technology* noviembre. pp. 967-978.
- Elmerich, C., Corrado, F., Bosouklian, H. y Bhandari, S. (1985). Cloning and characterization of the *glnA* gene of *Azospirillum brasilense* Sp7. 6th International Symposium on Nitrogen Fixation. Libro de resúmenes.
- Espín, G., Alvarez-Morales, A., Cannon, F., Dixon, R. y Merrick, M. (1982). Cloning of the *glnA*, *ntrB* and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 518-524.
- Foor, F., Cedergren, R.J., Streicher, S., Rhee, S.G. y Magasanik, B. (1978). Glutamine synthetase of *Klebsiella aerogenes*: properties of *glnD* mutants lacking uridylyltransferase. *J. Bacteriol.* **134**: 562-568.
- Foor, F., Reuveny, Z. y Magasanik, B. (1980). Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the PII protein in *Klebsiella aerogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **77**: 2636-2640.
- Franche, C., Canelo, E., Gauthier, D. y Elmerich, C. (1981). Mobilisation of the chromosome of *Azospirillum brasilense* by plasmid R68-45. *FEMS Microbiol. Letts.* **10**: 199-202.
- Fuchs, R.L. y Keister, D.L. (1980). Identification of two glutamine synthetase in *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* **141**: 996-998.
- Gauthier, D. y Elmerich, C. (1977). Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in *Spirillum liposorum*. *FEMS Microbiol. Letts.* **2**: 101-104.
- Ginsburg, A. y Stadtman, E.R. (1973). Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. En *The enzymes of glutamine metabolism*, ed. Prusiner, S. y Stadtman E.R., pp. 9-44. Academic Press, Nueva York.
- Gordon, J.K. y Brill, W.J. (1974). Derepression of nitrogenase synthesis in the presence of excess NH_4^+ . *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **59**: 967-969.
- Hardy, R.W.F. y Havelka, U.D. (1975). Nitrogen fixation research: a key to world food? *Science* **188**: 633-643.
- Hawkes, T., Merrick, M. y Dixon, R. (1985). Interaction of purified *ntrC* protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. 6th International Symposium on Nitrogen Fixation. Libro de resúmenes.
- Hennecke, H. y Shanmugam, K.T. (1979). Temperature control of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **123**: 259-265.
- Hill, S., Kennedy, C., Kavanagh, E., Goldberg, R.B. y Hanau, R. (1981). Nitrogen fixation gene (*nifL*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* **290**: 424-426.
- Imperial, J., Ugalde, R.A., Shah, V.K. y Brill, W.J. (1984). Role of the *nifQ* gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **158**: 187-194.
- Jara, P., Quiviger, B., Laurent, P. y Elmerich, C. (1983). Isolation and genetic analysis of *Azospirillum brasilense* *Nif*⁻ mutants. *Can. J. Microbiol.* **29**: 968-972.

- Kado, C.I. y Liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
- Kennedy, C. y Drummond, M. (1985). The use of cloned *nif* regulatory elements from *Klebsiella pneumoniae* to examine *nif* regulation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1787-1795.
- Klossak, R.M. y Bohlool, B.B. (1983). Prevalence of *Azospirillum spp.* in the rhizosphere of tropical grasses. *Can. J. Microbiol.* **29**: 649-652.
- Kondorosi, A., Svab, Z., Kiss, G.B. y Dixon, R. (1977). Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **151**: 221-226.
- Kumari, M., Kavimadan, S.K. y Subba Rao, M.S. (1976). Occurrence of nitrogen spirillum in roots of rice, sorghum, maize and other plants. *Ind. J. Exp. Biol.* **14**: 638-639. Citado por Elmerich, C. (1984). *Bio/Technology* noviembre, pp. 967-978.
- Kustu, S.G., Burton, D., Garcia, E., McCarter, L. y McFarland, N. (1979). Nitrogen control in *Salmonella*: regulation by the *glnR* and *glnF* gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **76**: 4576-4580.
- León, P., Romero, D., Garcíarrubio, A., Bastarrachea, F. y Covarrubias, A. (1985). Glutamine synthetase-constitutive mutation affecting the *glnALG* upstream promoter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **164**: diciembre, en prensa.
- Leonard, J.M. y Goldberg, R.B. (1980). Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **142**: 99-110.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the folin:phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Ludwig, R.A. (1980). Regulation of *Rhizobium* nitrogen fixation by the unadenylated glutamine synthetase I system. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **77**: 5817-5821.
- Magalhaes, F.M., Baldani, J.I., Souto, S.M., Duykendall, J.R. y Dobreiner, J. (1983). A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. brasil. Cienc.* **55**: 417-430. Citado por Elmerich, C. (1984). *Bio/Technology*, noviembre, pp. 967-978.
- Magasanik, B. (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* **16**: 135-168.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982). *En Molecular Cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York).
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-216.
- McLean, P.A. y Dixon, R. (1981). Requirement of *nifV* gene for production of wild type nitrogenase enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature* **292**: 655-656.
- McNeil, T., McNeil, D., Roberts, G.P., Supiano, M.A. y Brill, W.J. (1978). Fine structure mapping and complementation analysis of *nif* (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **139**: 253-266.
- McNeil, D. y Brill, W.J. (1980). Mutations in *nif* genes that cause *Klebsiella pneumoniae* to be derepressed for nitrogenase synthesis in the presence of ammonium. *J. Bacteriol.* **144**: 744-751.
- McNeil, T., McNeil, D. y Tyler, B. (1982). Fine-structure deletion map of the *glnA-glnL-glnG* region in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **150**: 1302-1323.

Meers, J., Tempest, D. y Brown, C. (1970). Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **64**: 187-194.

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

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

Merrick, M., Dixon, R. y Stewart, W.D. (1985). The role of the *ntrA* gene product in positive control of nitrogen fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*. 6th International Symposium on Nitrogen Fixation. Libro de resúmenes.

Miller, E. y Branchley, J. (1981). L-methionine SR-sulfoximine-resistant glutamine synthetase from mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **256**: 11307-11312.

Morett, E. (1984). Obtención y análisis de mutaciones que afectan la actividad de la nitrogenasa y de la glutamino sintetasa en *Rhizobium phaseoli*. Tesis profesional, Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM.

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

Mortenson, L.E. y Thorneley, R.N.F. (1979). Structure and function of nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 387-418.

Nagatani, H., Shimizu, M. y Valentine, R.C. (1971). The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. *Arch. Microbiol.* **79**: 164-176.

Nair, S.K., Jara, P., Quiviger, B. y Elmerich, C. (1983). Recent developments in the genetics of nitrogen fixation in *Azospirillum*. En *Azospirillum* II. Klingmiller, W. (ed), *Experientia Supplementum*, **48**, Birkhauser Verlag, Basel, pp. 29-38.

Nieva-Gómez, D., Roberts, G.P., Klevickis, S. y Brill, W.J. (1980). Electron transport to nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **77**: 2555-2558.

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

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

Ow, D.W., Sundaresan, V., Rothstein, D.M., Brown, S.E. y Ausubel, F.M. (1983b). Promoters regulated by the *glnG* (*ntrC*) and *nifA* gene products share a heptameric consensus sequence in the -15 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **80**: 2524-2528.

Pahel, G., Zelenets, A.D. y Tyler, B.M. (1978). *gltB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **133**: 139-148.

Pahel, G. y Tyler, B.M. (1979). A new *glnA*-linked regulatory gene for glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **76**: 4544-4548.

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

Pedrosa, F. y Yates, M. (1984). Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiol. Letts.* **23**: 95-101.

- Plasinski, J., Dart, P. y Rolfe, B. (1983). Plasmid visualization and *nif* gene location in nitrogen fixing *Azospirillum* strains. *J. Bacteriol.* **155**: 1429-1433.
- Polsinelli, M., Baldani, E., Bazzicalupo, M. y Gallori, E. (1980). Transfer of plasmid pRD1 from *Escherichia coli* to *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* **178**: 709-711.
- Quiviger, B., Franche, C., Lutfalla, G., Rice, D., Haselkorn, R. y Elmerich, C. (1982). Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. *Biochemie* **64**: 495-502.
- Reuveny, Z., Foor, F. y Magasanik, B. (1981). Regulation of glutamine synthetase by regulatory protein PII in *Klebsiella aerogenes* mutants lacking adenylyltransferase. *J. Bacteriol.* **146**: 740-745.
- Riedel, G.E., Ausubel, F.M. y Cannon, F.C. (1979). The physical map of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **76**: 2866-2870.
- Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Hodes, C. y Berg, P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**: 237-251.
- Roberts, G.P., McNeil, T., McNeil, D. y Brill, W.J. (1978). Regulation and characterisation of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **138**: 267-279.
- Ronslo, R., Rowe, W. y Meister, A. (1969). Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry* **8**: 1066-1075.
- Ruvkun, G. y Ausubel, F.M. (1980). Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **77**:191-195.
- Shah, V.K. y Brill, W.J. (1977). Isolation of an iron molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **74**: 3249-3253.
- Shah, V.K., Stacey, G. y Brill, W.J. (1983). Electron transport to nitrogenase: purification and characterisation of pyruvate flavodoxin oxydoreductase, the *nifH* gene product. *J. Bio. Chem.* **258**: 12064-12068.
- Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1970). Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). En *Methods in enzymology*. Vol. XVIII, ed. Tabor, H. y White-Tabor, C. Academic Press, Nueva York. pp. 910-922.
- Strelcher, S.L., Shanmugam, K.T., Ausubel, F.M., Morandi, C. y Goldberg, R.B. (1974). Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator for nitrogenase synthesis. *J. Bacteriol.* **120**: 815-821.
- Stewart, W.D.P. y Rowell, P. (1975). Effects of L-methionine-DL-sulfoximine on the assimilation of newly fixed NH_3 , acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **65**: 846-856.
- St. John, R.T., Shah, V.K. y Brill, W.J. (1974). Regulation of nitrogenase synthesis by oxygen in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **119**: 266-269.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-518.
- Sundaresan, V., Ow, D.W. y Ausubel, F.M. (1983). Activation of *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti* nitrogenase promoters by *gln* (*nif*) regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **80**: 4030-4034.

Tarrand, J.J., Krieg, N.R. y Dobereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus *Azospirillum* gen. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **24**: 967-980.

Tien, T.M., Gaskins, M.H. y Hubbel, D.H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) *Appl. Environm. Microbiol.* **37**: 1016-1024.

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

Tubb, R.S. (1974). Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella*. *Nature* **251**: 481-485.

Turner, N.E., Robinson, S.J. y Haselkorn, R. (1983). Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular fixed nitrogen. *Nature* **306**: 337-342.

Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 1127-1182.

Umall-Garcia, M., Hubbel, D.H., Gaskins, M.H. y Dazzo, F.B. (1980). Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environm. Microbiol.* **39**: 219-226.

Verma, D.P.S. y Long, S. (1983). The molecular biology of *Rhizobium*-legume symbiosis. En: *International review of cytology*. Suppl.14. Jeon, K. (ed). Academic Press Nueva York, pp. 211-245.

Zhu, J. y Brill, W.J. (1981). Temperature sensitivity of the regulation of nitrogenase synthesis by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **145**: 116-118.

Agradecimientos

A mi maestro, Dr. Fernando Bastarrachea, quien dirigió este trabajo, y quien siempre me brindó su apoyo y mantuvo la confianza en mí.

Muy especialmente a Laura Camarena. Compañera incomparable cuya integridad, sencillez, sonrisa y fuerza interna son sus herramientas de triunfo. El tiempo que trabajamos juntas durante el sabático del Dr. Bastarrachea resulta insustituible. El desarrollo de este proyecto se habría visto truncado de no ser por el trabajo en común, los acuerdos y las invaluable discusiones sostenidas entre las dos.

A mis sinodales, Alicia González, Guadalupe Espín, Guillermo Dávila, Carlos Arias y Fernando Bastarrachea, por haber accedido a leer este trabajo, por sus valiosas opiniones y discusiones enriquecedoras.

A mis maestros Fernando Bastarrachea, Horacio Merchant, Rafael Palacios, Jaime Mora, Raúl Mancilla.

Al Dr. Francisco Bolívar y el Dr. Edmundo Calva, por el apoyo que me brindaron al otorgarme un espacio de trabajo y material para la realización de la Biología Molecular en este trabajo.

A mis amigos.....ellos saben quienes son.

Especialmente a Alberto, Ilya y Susan quienes han sido pilares de apoyo en mi camino.

A Max, quien hizo posible la tipografía e impresión de este trabajo, por su ayuda desinteresada.