

03081

1
2ej



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION
DE NITROGENO U.N.A.M.**

**Relación entre la asimilación de amonio y
la fijación de nitrógeno en Rhizobium phaseoli**

T E S I S

Que para obtener el Título de
Doctor en Investigación Biomédica Básica
p r e s e n t a

Lic. Ma. Alejandra Bravo de la Parra

México, D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1.- Introducción	1
a) <u>Klebsiella</u>	2
b) <u>Azotobacter</u>11
c) <u>Rhodospseudomonas</u>13
d) <u>Azospirillum</u>14
e) <u>Anabaena</u>17
f) <u>Frankia</u>19
g) <u>Rhizobium</u>20
2.- Objetivos26
3.- Resultados.29
a) Ammonium assimilation in <u>Rhizobium phaseoli</u> by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway.30
b) Introduction of the <u>Escherichia coli gdhA</u> gene into <u>Rhizobium phaseoli</u> : effect on nitrogen fixation.35
c) Isolation and characterization of a Tn5 induced mutant of <u>Rhizobium phaseoli</u> affected in the GSII activity and nitrogen fixation39
4.- Discusión51
5.- Referencias60

INTRODUCCION

La asimilación de amonio consiste en la incorporación del ión amonio en esqueletos de carbono formando moléculas orgánicas (glutamato y glutamina). Estas moléculas son donadoras del nitrógeno para la síntesis de los demás compuestos nitrogenados celulares: amino ácidos, aminoazúcares, vitaminas purinas y pirimidinas, compuestos que a su vez participan en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y demás macromoléculas celulares.

La disponibilidad del nitrógeno en el medio ambiente es limitada en comparación con la disponibilidad de los otros constituyentes celulares, tales como el carbono, el hidrógeno y el oxígeno. Esta limitación ha originado que los seres vivos hayan desarrollado múltiples estrategias para encontrar el nitrógeno, transportarlo al interior y asimilarlo. La glutamato deshidrogenasa (GDH) y la glutamino sintetasa (GS) son las únicas enzimas capaces de incorporar el amonio en moléculas orgánicas. La GDH cataliza la reacción de la síntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato, NADPH y amonio y la GS cataliza la reacción de síntesis de glutamina a partir de glutamato, ATP y amonio. La GS es una enzima que presenta una afinidad por amonio mucho más alta que la GDH. Estas dos enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos, en tejidos animales y en plantas superiores.

En muchos microorganismos se ha visto que cuando la fuente de nitrógeno es limitante para el crecimiento, la capacidad de asimilar amonio es incrementada, ya sea aumentando la síntesis o la actividad de las enzimas que asimilan amonio. Generalmente se induce la utilización de la vía GS-GOGAT, la cual es más eficiente en tomar amonio, dada la alta afinidad de la GS por este metabolito. La limitación de nitrógeno, también causa la inducción de otras enzimas responsables de la producción de amonio de fuentes alternativas de nitrógeno combinado, como la utilización de nitrato y el catabolismo de aminoácidos. Algunos microorganismos han desarrollado la capacidad de utilizar nitrógeno atmosférico (N_2) como fuente de nitrógeno para crecer, cuando en el medio ambiente hay ausencia de este metabolito.

La habilidad de fijar nitrógeno atmosférico en amonio es una propiedad que se encuentra distribuida entre varios microorganismos de diferentes habitats. La enzima que cataliza esta reacción es la nitrogenasa, siendo un proceso que consume una gran cantidad de energía. Se ha calculado que se requieren de 12 a 15 moléculas de ATP, para que cada molécula de N_2 sea reducida a 2 NH_3 (1). Así la capacidad de fijar nitrógeno depende directamente de la capacidad de generar ATP y poder reductor de la célula.

En los diferentes microorganismos diazotróficos estudiados, se ha encontrado que la asimilación de amonio se encuentra muy inducida cuando la célula fija nitrógeno. En estas condiciones la concentración intracelular de amonio es muy baja. En Bacillus

macerans se ha reportado que la concentración de amonio en las células que fijan nitrógeno es de 1.4 mM (2).

En esta revisión presentaré un estudio sobre los sistemas de asimilación de amonio que operan en diversos microorganismos capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Así mismo se revisará su regulación y la relación regulatoria entre la asimilación de amonio y la fijación de nitrógeno.

Klebsiella

Klebsiella es una bacteria diazotrófica. En este microorganismo se han encontrado las dos vías de asimilación de amonio, las cuales están reguladas por la disponibilidad de nitrógeno en el medio.

1.- Bajo condiciones donde el amonio intracelular es alto, este se asimila a través de la GDH (3).

2.- Bajo condiciones de limitación de amonio, opera el sistema alternativo que consiste en las reacciones acopladas de la GS y de la glutamato sintasa (GOGAT) (3).

La GS de Klebsiella es muy parecida a la GS de Escherichia coli, tienen un peso aproximado de 600,000. Esta compuesta de doce subunidades idénticas arregladas en dos anillos hexagonales, acomodados uno sobre otro (4). La GS en este microorganismo es una enzima que está regulada por diferentes mecanismos:

a) Represión y derepresión de la síntesis en respuesta a variaciones en la concentración de amonio y de la fuente de carbono en el medio de cultivo.

b) Inhibición por retroalimentación por múltiples productos del metabolismo de glutamina.

c) Interconversión de la forma activa (taut) a inactiva (relaxed) en respuesta a fluctuaciones en las concentraciones de iones divalentes.

d) Modulación de la actividad catalítica mediante adenilación y desadenilación de la enzima, en respuesta a cambios en señales metabólicas como son glutamina, 2-oxoglutarato, ATP y Pi.

En cuanto a la regulación a nivel de transcripción de la GS de Klebsiella, se ha encontrado que existe un sistema genético muy complejo en el cual participan varias proteínas reguladoras codificadas por los genes ntrA (glnF), ntrB (glnL) y ntrC (glnG). Los genes ntrB y ntrC forman parte del mismo operón junto con el gene glnA que es el gene estructural de la GS (Fig.1).

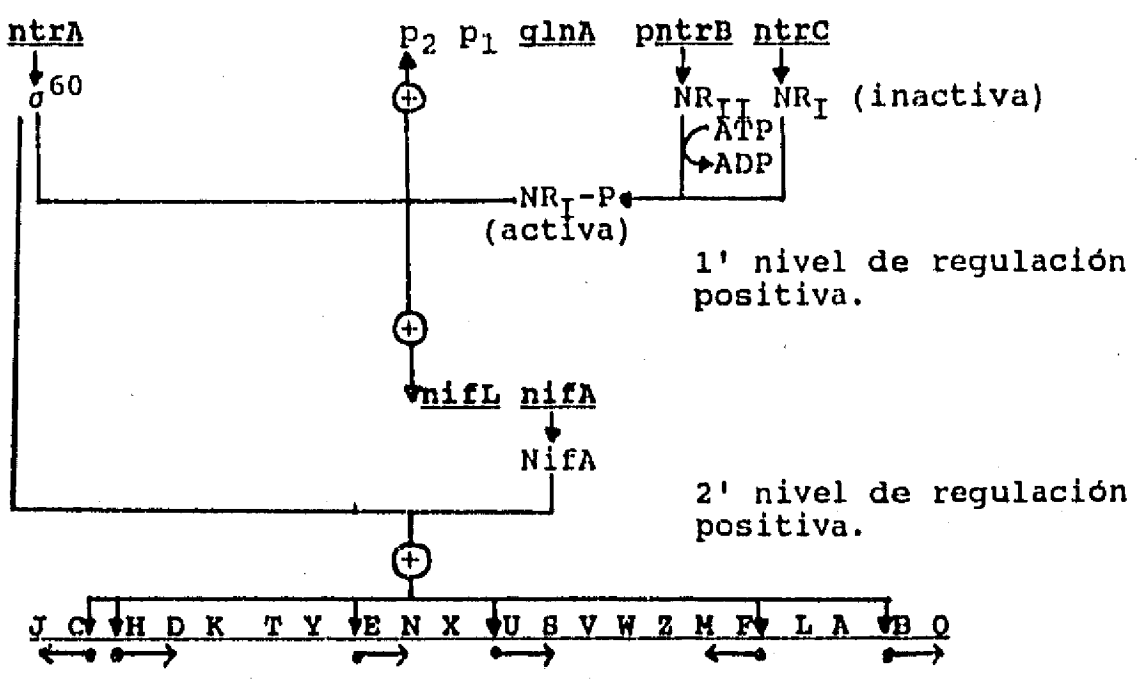


Figura 1.- Modelo de regulación del sistema general de nitrógeno y de inducción de los genes nif en Klebsiella.

El producto del gen ntrA se requiere para la activación de la expresión del gen glnA. También se requiere para activar la expresión de genes ntr que responden a la limitación de nitrógeno, como son los de utilización de aminoácidos (arg, pro e his) y otros compuestos de nitrógeno combinado así como aquellos genes responsables de la fijación de nitrógeno (5). Recientemente se ha encontrado que el gen ntrA codifica para una subunidad sigma de la RNA polimerasa (6). Este factor σ^{60} confiere especificidad a la RNA polimerasa, para reconocer secuencias promotoras específicas. Los promotores dependientes de ntrA, no tienen la secuencia consenso de -35 y -10 reportada para los promotores de bacterias GRAM negativas sino que presentan una secuencia consenso específica, en la región -26 CTGGYAYR-N4-TTTGCA -10 (7). Este tipo de promotor, se ha encontrado por ejemplo en la región 5' del gen glnA y en los genes estructurales de la nitrogenasa. Para que el producto de ntrA ejerza su acción sobre el promotor, requiere la presencia de la proteína reguladora codificada por ntrC, para actuar sobre los genes relacionados con disponibilidad de amonio ó de la proteína codificada por nifA, para activar los genes de fijación de nitrógeno.

En cuanto a la regulación del gen ntrA, se ha encontrado que se sintetiza constitutivamente (8,9). Lo cual sugiere que las células siempre tienen una población de RNA polimerasa unida al producto de ntrA.

Las mutantes estructurales en ntrA están afectadas en la expresión de glutamino sintetasa, produciendo niveles extremadamente bajos de GS, por lo que para poder crecer requiere

que el medio sea suplementado con glutamina. Estas mutantes también están afectadas en la utilización de aminoácidos como fuentes de nitrógeno y en su capacidad de fijar nitrógeno (10).

El producto del gen ntrC (NR_I) es una proteína reguladora bifuncional, ya que activa o reprime la síntesis de la GS. Este gen forma parte de un operón junto con los genes glnA y ntrB de manera idéntica al encontrado en E.coli (11).

Mutantes en ntrC resultan en un fenotipo Gln^- (12) ya que sintetizan niveles bajos constitutivos de GS y además tienen una pérdida parcial de la regulación de la GS, ya que en vez de observarse una inducción de 50-100 veces, cuando las células crecen en un medio que induce la derepresión de GS, se observa tan sólo un aumento de 3-4 veces de la actividad de GS.

El gen ntrB codifica para un antiactivador que impide que el producto de ntrC (NR_I), active la síntesis de GS. En E.coli se ha descrito que ntrB codifica para una kinasa que fosforila a NR_I para activarlo y que lo desfosforila para inactivarlo (13). Estas dos actividades ejercidas por el producto de ntrB (NR_{II}) están a su vez reguladas por los productos de dos genes, glnB y glnD. Estos genes codifican para la proteína PII y la uridiltransferasa (proteínas pertenecientes al sistema de regulación por adenilación, como se verá más adelante) la proteína PII en un estado no-uridilado, interacciona con NR_{II} induciendo la defosforilación de NR_I . El estado funcional de la proteína PII, a su vez, depende de la actividad de la uridiltransferasa. La UTasa es capaz de censar la relación entre el nitrógeno y el carbono, es decir los niveles intracelulares de α -cetoglutarato y de glutamina. Así la actividad de NR_{II} y por lo tanto la inducción de la síntesis de GS, esta regulada por un sistema de cascada muy sensible a la disponibilidad de amonio (Fig.2).

Mutantes en el gen ntrB inducidas por una inserción del transposón Tn5, presentan un fenotipo bajo constitutivo en la síntesis de GS y son Ntr^- (14). Este fenotipo se explica porque mutaciones en este gen son polares sobre ntrC, produciendo el mismo fenotipo que las mutantes en ntrC. Por otro lado se ha reportado que las mutantes en ntrB suprimen el fenotipo Gln^- de las mutantes en glnB o en glnD (15,24). Estas dos mutantes producen una proteína PII incapaz de ser uridilada, dando como resultado la inducción de la adenilación de la GS, pero además estas mutantes producen niveles muy bajos de GS, ya que PII se encuentra siempre en el estado nativo, en el cual interacciona con NR_{II} activando la defosforilación de NR_I y por lo tanto inactivando la transcripción de GS (Fig.2).

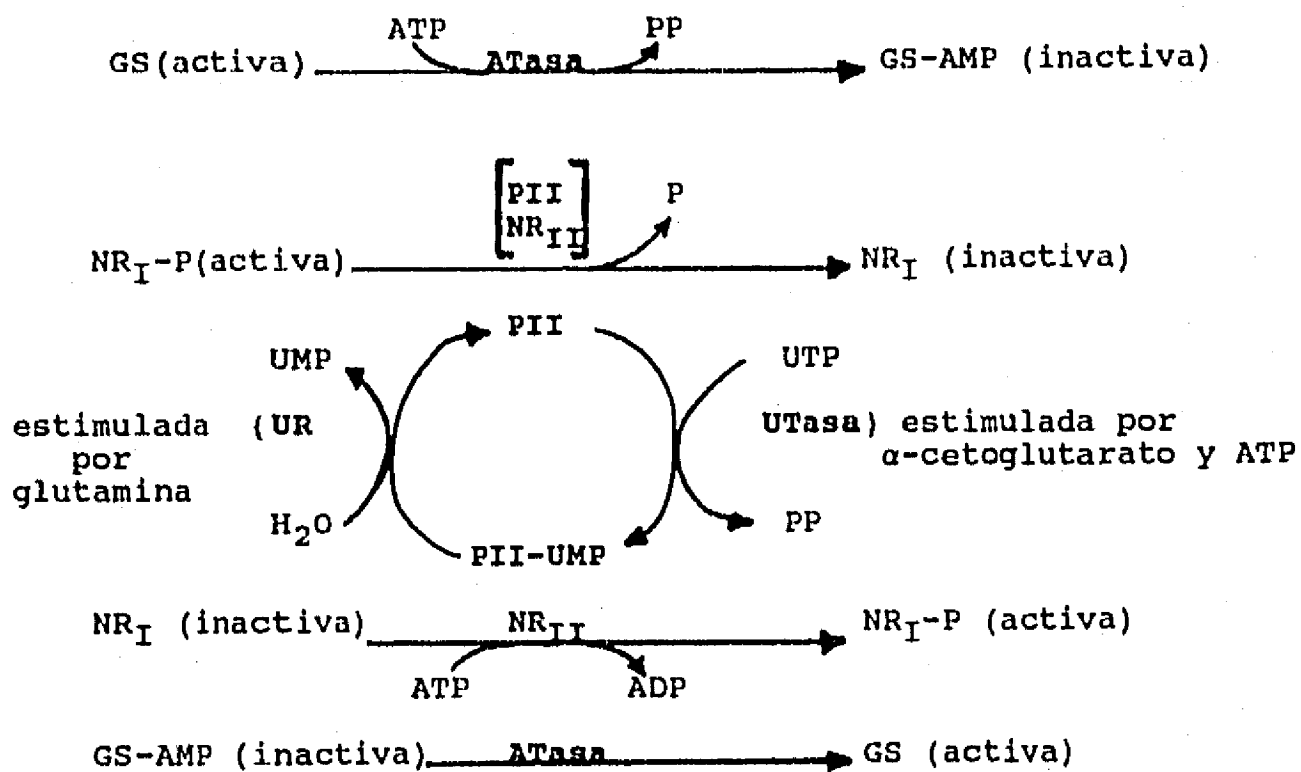


Figura 2.- Modelo de regulación de la actividad de glutamino sintetasa por las proteínas PII y uridiltransferasa.

En cuanto a la regulación del operón de glnA ntrB ntrC, se ha descrito la existencia de dos promotores en la región 5' de glnA y otro antes de ntrB (16). Los promotores de glnA se encuentran cotiguos, semejante a lo reportado para E.coli (17). El promotor glnAp1 requiere de la proteína CAP asociada con AMP cíclico, este es un promotor debil que sirve para mantener niveles de transcripción de GS en condiciones de exceso de nitrógeno y de limitación de carbono. Este promotor presenta la secuencia concenso de -35 y -10 de los promotores de enterobacterias.

El segundo promotor glnAp2 requiere del producto de ntrA (σ^{60}) y del de ntrC (NR_I) y de condiciones de limitación de amonio. El promotor glnAp2 presenta el concenso de -27 y -11 presente en los promotores activados por ntrA (Fig.1). Además se ha descrito que la expresión de glnA a partir del promotor glnAp2 es incrementada en un sitio enhancer, localizado -100 a -130 pares de bases hacia arriba. Este sitio se requiere cuando la concentración del activador es baja y se propone que es un sitio de unión de NR_I al DNA, para facilitar la acción de la RNAPolimerasa y el σ^{60} (18).

La regulación de la GS de Klebsiella por el sistema de adenilación permite una respuesta muy rápida a cambios en el medio ambiente. Consiste en la inactivación de actividad

biosintética, mediante la unión covalente de grupos adenilo, a un residuo de tirosina específico, en cada una de las doce sub-unidades (19). Wolheuter, Schutt y Holzer han propuesto que en Escherichia coli la inactivación de la GS por el sistema de adenilación, es indispensable en condiciones de cambios bruscos en la disponibilidad de amonio. Específicamente en cambios de condiciones de limitado a exceso de amonio (20). Estos autores se basan en determinaciones de pozas de metabolitos (glutámico, glutamina y ATP) durante los primeros minutos después del cambio de medio. Sugieren que el papel de la adenilación de la GS es prevenir que la poza de ATP sea depletada y que se acumule un exceso de glutamina.

La adenilación es un proceso reversible y se lleva a cabo mediante la acción de tres proteínas (Fig.2) :

1.- La adeniltransferasa (ATasa) codificada por el gene glnE, que cataliza las reacciones de adenilación y desadenilación de la GS. Mutantes en glnE mantienen una GS en la forma no modificada la cual se considera totalmente activa. Estas mutantes presentan una severa inhibición del crecimiento cuando se cambia el cultivo de limitación a un exceso de amonio, en donde la GS no es adenilada consumiéndose la poza de glutamato y sintetizando una gran cantidad de glutamina que incluso puede ser excretada (19). Estas mutantes presentan una regulación normal en la síntesis de la GS en respuesta a amonio (21).

2.- La proteína PII se encarga de modular la actividad de la ATasa. Esta proteína presenta dos estados el uridilado y el no uridilado, los cuales dependen del estado intracelular de los metabolitos glutamina y α -cetoglutarato. Cuando la proteína PII esta uridilada estimula a la ATasa a desadenilar a la GS y cuando se encuentra no-uridilada estimula la adenilación. Como se menciono anteriormente, se ha descrito que la proteína PII en el estado nativo interacciona con NR_{II} induciendo la actividad de desfosforilación de NR_I , lo cual resulta en la baja transcripción de glnA. La proteína PII esta codificada por el gene glnB, algunas mutantes descritas en este gen, producen una proteína PII alterada que no puede ser convertida a la forma uridilada en que induce la desadenilación de la GS (22), produciendo así una GS totalmente adenilada. Además estas mutantes presentan baja transcripción de glnA ya que PII no-uridilada induce la inactivación de NR_I y por lo tanto presentan un fenotipo Gln^- y Ntr^- . También se ha descrito mutantes por inserción de Tn5 en glnB, incapaces de producir proteína PII, las cuales tienen un fenotipo Gln^+ , presentando niveles altos constitutivos en la síntesis de GS y son Ntr^+ (23). Es decir que son capaces de inducir las enzimas controladas por el sistema general de nitrógeno.

3.- La uridiltransferasa (UTasa) es la enzima que uridila a la proteína PII cuando las concentraciones del α -cetoglutarato y del ATP se encuentran altas y la concentración de glutamina se encuentra baja. Cuando la relación de estos metabolitos se invierte la UTasa desuridila a PII. La UTasa esta codificada por

el gene glnD, mutantes en éste gene son incapaces de crecer en ausencia de glutamina, debido a que la GS se encuentra muy adenilada (24), además que los niveles de GS se encuentran muy bajos y presentan fenotipo Ntr^- . Esto se debe al que al faltar UTasa la proteína PII siempre se encuentra en el estado nativo, donde induce la inactivación de NR_I .

En cuanto a las enzimas que sintetizan glutamato, en Klebsiella se encuentran la GDH y la GOGAT. La GOGAT está codificada por los genes gltB y gltD. Mutantes en el gen gltB son incapaces de crecer en concentraciones de amonio menores de 1 mM (3), tampoco crecen en compuestos cuyo catabolismo conduce a la producción de amonio como son urea o nitrato. Se ha descrito que las mutantes en este gene son incapaces de crecer en fuentes orgánicas de nitrógeno como arginina, prolina o histidina cuyo catabolismo conduce a la producción de glutamato (3). La explicación que en un principio se dió para este fenotipo, fue que al no existir actividad de GOGAT, la célula no puede bajar la poza de glutamina lo suficiente para inducir la transcripción de glnA. Esta explicación se basó en el hecho de que mutantes en ntrB suprimen este fenotipo, permitiendo la utilización de estos metabolitos presentando un fenotipo alto constitutivo para GS. Posteriormente se reportó que en E. coli, el fenotipo Ntr^- de las mutantes en gltB, se debe a que este gen forma parte de un operón junto con los genes gltD y gltF. En donde el producto del gen gltF, esta involucrado en la regulación de Ntr (25), por lo que las mutantes en gltB son polares sobre gltF. Posiblemente en Klebsiella también exista el gen gltF y así el fenotipo Ntr^- de las mutantes en gltB, se deba también a este gen.

En cuanto a la GDH, se ha reportado que la regulación de la actividad de GDH en Klebsiella a diferencia de lo observado en E. coli y de S. typhimurium, esta regulada por las proteínas reguladoras del sistema Ntr . La regulación de la GDH se presenta en sentido opuesto a la regulación observada para la GS. Así la inducción de la GDH es muy alta en condiciones de exceso de amonio y muy baja en bajo amonio (3). Mutantes en ntrA o en ntrC producen una inducción elevada de la GDH, aún en células crecidas en limitación de nitrógeno (26). Por el contrario mutantes en ntrB resultan en la ausencia de GDH (3,27). Como consecuencia de la represión de la GDH en las mutantes en ntrB, se ha reportado que las dobles mutantes gltB-ntrB- son incapaces de utilizar amonio como fuente de nitrógeno (3). Lógicamente también las dobles mutantes gltB-gdhA- tampoco pueden utilizar amonio y requieren glutamato para poder crecer (28).

En cuanto a la fijación de nitrógeno, en Klebsiella se ha reportado la existencia de 21 genes nif, agrupados en 7 u 8 operones (29), comprendidos en una región de 23Kb de DNA. Estos operones nif, estan sujetos a regulación positiva en dos niveles y también a regulación negativa, en respuesta a concentraciones altas de amonio y de oxígeno.

El primer nivel de regulación positiva esta mediado por el sistema Ntr , así en condiciones de limitación de amonio, los productos de los genes ntrA y ntrC activan la transcripción del

operón *nifLA* (14,30). El segundo nivel de regulación positiva esta mediado por los productos de *nifA* y de *ntrA* los cuales actúan activando la transcripción de los otros operones *nif* (31) (Fig.1). De esta manera existe una regulación muy fina de la inducción de los genes *nif*, la cual involucra un sistema de cascada muy sensible a la disponibilidad del amonio en el medio ambiente. Se ha descrito que mutaciones puntuales en *glnB*, que producen una proteína PII incapaz de ser uridilada tienen un fenotipo $Gln^- Nif^-$, ya que no activan el operón *nifLA* (22). Mientras que mutantes que no producen PII, presentan una regulación igual que la cepa silvestre en cuanto a la expresión del operón *nifLA* (23). Este dato hace suponer que en ausencia de PII, el sistema NtrBC sigue siendo capaz de responder a cambios en la disponibilidad de nitrógeno (32). El fenotipo de las mutantes PII⁻, así como la regulación residual de *glnA* en las mutantes carentes de NR_{II}, se pueden explicar por un mecanismo de intercomunicación entre diferentes sistemas regulatorios (modulador/efector). Se ha reportado que existen grandes semejanzas en la composición de aminoácidos del sensor y del regulador de diferentes sistemas regulatorios, que se encargan de modular la expresión de un grupo específico de genes, en respuesta a cambios en el medio ambiente (33) (Fig. 3). Entre estos sistemas se encuentran los que corresponden a la osmolaridad (*envZ/ompR*), a la limitación de fosfato (*phoR/phoB*), los genes de virulencia de *Agrobacterium* (*virA/virG*), los genes que activan el transporte de ácidos dicarboxílicos (*dctB/dctD*), los que responden a la limitación de nitrógeno (*ntrB/ntrC*) y los que activan la fijación de nitrógeno (*nifL/nifA*). En todos estos sistemas el primer componente actúa como sensor, el cual trasmite la señal al segundo componente, el cual actúa como regulador.

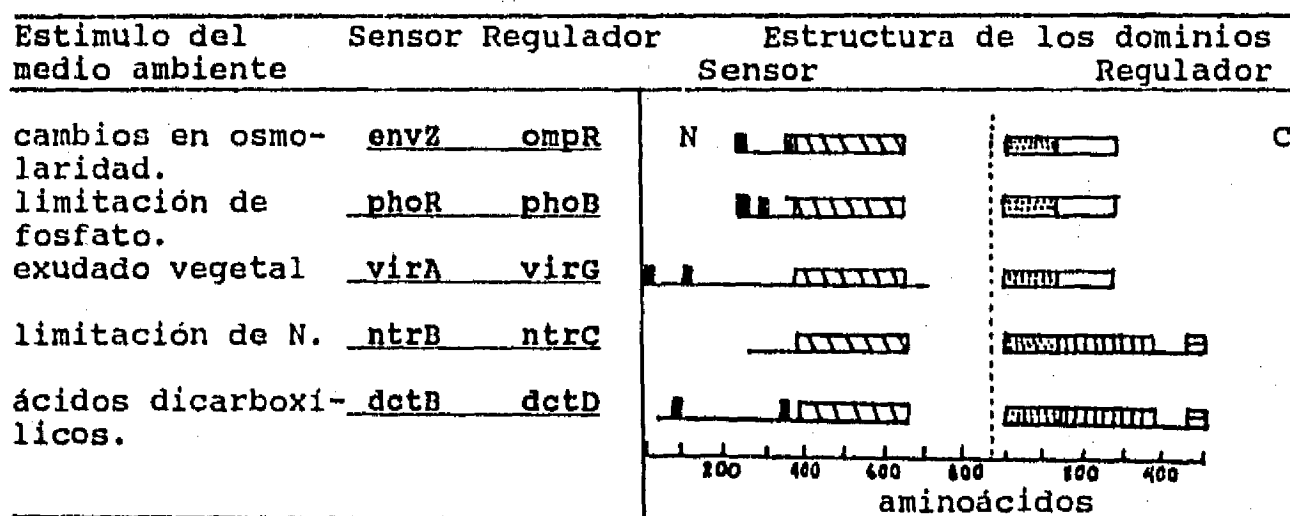


Figura 3.- Dominios conservados en los sistemas regulatorios de dos componentes. (modulador/efector)
 Las barras negras indican regiones hidrofóbicas. Las demás barras indican los dominios conservados entre las diferentes proteínas (33).

En este modelo se propone que la proteína sensora, percibe el estímulo del medio ambiente, utilizando la región amino-terminal, posiblemente mediante la unión de un ligando. En la región amino-terminal del sensor de varios sistemas, se han identificado dos regiones hidrofóbicas, este dato sugiere que posiblemente algunos de los sensores son proteínas transmembranales. La proteína sensora transmite la señal a la región carboxilo-terminal, mediante una alteración alostérica. La región C-terminal del sensor interacciona con la región amino-terminal de la proteína reguladora. Esta proteína recibe la señal y responde cambiando la conformación de la región C-terminal de inactiva a activa. Se ha demostrado que en sistema ntrB/ntrC el producto de ntrB fosforila al de ntrC para activarlo (13). Se ha visto que la región C-terminal de las proteínas reguladoras, tiene características estructurales que permiten interacciones con DNA, con la RNapolimerasa ó con sus factores sigma. Así se ha descrito que algunos sistemas (dctC, ntrC, nifA) son dependientes de la presencia del factor sigma codificado por el gen ntrA.

En todos estos sistemas la transcripción y la traducción de los dos componentes está acoplada. El sensor es producido a niveles mucho más bajos que el regulador. La gran homología entre los diferentes sistemas, abre la posibilidad de que exista intercomunicación y que el sensor de un sistema pudiera activar al regulador de otro sistema. Se ha demostrado que *in vitro* la proteína NR_{II} puede fosforilar al producto del gen cheY involucrado en la regulación de quimiotaxis y que a su vez la proteína CheA puede fosforilar a NR_I. Además una expresión alta de NR_{II} puede suprimir el fenotipo de una mutante en el gen cheA (34).

El producto de nifA es muy parecido al de ntrC (30). Se ha visto que el producto de nifA puede sustituir al producto de ntrC en la activación de los genes de asimilación de nitrógeno, como son glnA, put, aut y hut, pero que el producto de ntrC es incapaz de activar los operones nif de Klebsiella (30). Esta diferencia podría deberse a que los operones nif presentan una secuencia llamada UAS (upstream activator sequence) localizada a unos 100 pb del sitio de inicio de la transcripción. Se propone que estos sitios son el lugar en donde se une nifA, para activar la transcripción de los operones nif (35).

Por último en cuanto a la regulación negativa de los genes nif se sabe que está mediada por el producto de nifL, el cual responde al incremento en amonio o en oxígeno (36), inactivando a NifA. Se propone que la regulación por oxígeno del operón nifLA, esta mediada por los niveles de super-enrollamiento del DNA, dependiente de la actividad de girasa. La actividad de esta enzima se incrementa en condiciones de anaerobiosis. Se ha visto que si se agrega un inhibidor específico de girasa a células crecidas en anaerobiosis, se inhibe la expresión del operón nifLA (37).

Así hemos visto que Klebsiella es un microorganismo que posee una regulación muy fina de su metabolismo de nitrógeno y que existe una relación regulatoria entre el control de la asimilación de amonio y el control de la expresión de la fijación de nitrógeno. Ahora presentaré otros microorganismos capaces de fijar nitrógeno a fin de estudiar otros aspectos en la regulación de estos dos procesos.

Azotobacter

Azotobacter pertenece a la familia Azotobacteraceae. Los miembros de esta familia son bacterias aeróbicas capaces de fijar nitrógeno. Algunas especies sintetizan poli- β -hidroxibutirato, pigmentos y hormonas vegetales. Algunas se asocian a raíces de ciertas plantas como Azotobacter paspali al pasto Paspalum notatum (38).

Este es el primer microorganismo en donde se ha encontrado la presencia de más de un tipo de nitrogenasa (39). Encontrándose la enzima dependiente de molibdeno llamada nitrogenasa-1, una dependiente de vanadio (40), llamada nitrogenasa-2 y una tercera, nitrogenasa-3 compuesta de átomos de fierro y azufre (41). Estos tres sistemas son excluyentes, de tal manera que se requiere la presencia de Mo para expresar la nitrogenasa-1 y suprimir la expresión de los otros dos sistemas. Se requiere la presencia de vanadio para inducir la nitrogenasa-2 y suprimir a la nitrogenasa-3, esta última se expresa en ausencia de estos dos metales. Otra característica única de Azotobacter es su gran tolerancia a oxígeno cuando fija nitrógeno.

En cuanto a la asimilación de amonio en Azotobacter, se ha descrito que este se asimila por la vía GS-GOGAT y que no es posible detectar actividad de GDH (42). Se ha reportado que los niveles de GOGAT no varían con la fuente de nitrógeno (43), ni se reprime por amonio (44). En Azotobacter existen dos formas de GOGAT, una soluble y otra unida a membrana. La proporción de estas formas varía cuando cambian las condiciones de aereación del cultivo (45).

La GS de Azotobacter es muy similar a la GS de enterobacterias, presentando una estructura de dodecámero, con subunidades de peso molecular alrededor de 53,000. Cada subunidad es susceptible a adenilación (46). Se ha reportado que los niveles absolutos de GS no varían con la fuente de nitrógeno (44) y que la transcripción de glnA no requiere de las proteínas reguladoras codificadas por ntrC y ntrA (47), ya que mutantes en estos genes presentan niveles normales de GS (47). Los genes ntrBC se localizan adyacentes a glnA y se transcriben en la misma dirección. glnA y ntrBC presentan cada uno su propio promotor (47). A la fecha no se han presentado evidencias de que los tres genes esten estructurados en un operón (Fig.4).

Las mutantes de GS aisladas en este microorganismo son parciales (48), no se han podido aislar mutantes totales, se cree que la glutamina es uno de los aminoácidos que no se importa al interior de la célula, por lo que no se pueden aislar auxótrofos de glutamina.

Las mutantes en ntrC descritas, no pueden crecer en nitrato y si en aminoácidos o en urea. Las mutantes en ntrA tampoco crecen en nitrato ni en nitrógeno molecular, ya que no pueden fijar nitrógeno (47). Ambas mutantes a diferencia de las mutantes en Klebsiella no requieren glutamina para crecer ya que como se mencionó, estos genes no controlan la transcripción de glnA.

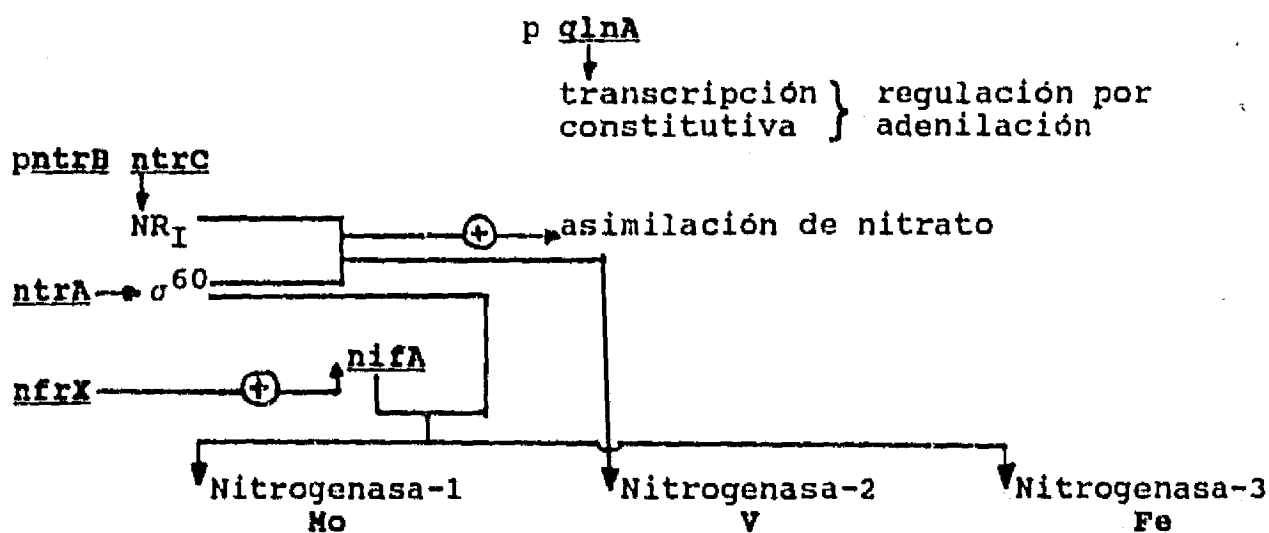


Figura 4.- Modelo de los sistemas regulatorios de la asimilación de amonio y la fijación de nitrógeno en *Azotobacter*.

En cuanto a la fijación de nitrógeno se sabe que existen reiteraciones del gene estructural de la nitrogenasa y que estas reiteraciones corresponden a los genes de la nitrogenasa-1,2 y 3. La secuencia de los genes *nifHDK* es muy parecida a la reportada para *Klebsiella*, también se ha reportado la secuencias de los operones *nifEN*, *nifUSVM* y *nifF* (49). Una serie de mutantes *nif⁻* aisladas por inserción de Tn5, han demostrado que algunos genes son necesarios para los tres sistemas y que otros sólo para la fijación de nitrógeno en ausencia de molibdeno (49).

En cuanto a la regulación de la fijación de nitrógeno, primero diré que la presencia o ausencia de los diferentes metales determina cual de las nitrogenasas es la que va a funcionar. Se ha encontrado la secuencia consenso de -24 y -12 en los promotores de *nifH* y de *nifE*. Esta estructura de los promotores sugiere que estos genes son regulados por *ntrA*. Las mutantes en *ntrA* reportadas son *Nif⁻* (47), estas mutantes carecen de las tres nitrogenasas. El gene *ntrC* no está involucrado en la regulación de la fijación de nitrógeno de los sistemas de Mo y Fe, pero es necesario para la expresión de la nitrogenasa de vanadio. Se propone que el producto de *ntrC* activa la transcripción de algún otro gen activador, que a su vez activa el gen *nifH** (de vanadio). Ya que *ntrC* no activa la transcripción de fusiones de *nifH***lacZ* en *E.coli* (50). Además que el producto de *nifA* de *Klebsiella* tampoco activa la expresión de las fusiones de *nifH** (de vanadio) *lacZ* en *E.coli* (50) por lo que se propone que se requiere de otro activador diferente de *nifA* para inducir la expresión de la nitrogenasa de vanadio.

Por último se ha reportado la existencia de un nuevo gen regulatorio designado *nfrX* que regula a *nifA* (51). Mutaciones en este gen son *Nif⁻*. Los genes *nifA* y *nfrX* se requieren para la

expresión de los sistemas de Mo y de Fe (29) (Fig.4).

De esta manera encontramos que en Azotobacter existe la reiteración de la función de nitrogenasa, con la presencia de varios sistemas dependientes de diferentes metales. Y que existe una división de los circuitos regulatorios nifA y ntrC para activar los diferentes sistemas de fijación de nitrógeno.

Rhodopseudomonas.

Rhodopseudomonas es una bacteria púrpura fototrófica, capaz de fijar nitrógeno y bióxido de carbono. Esta bacteria es muy interesante ya que puede crecer autotrófica y heterotróficamente, en la luz o en la oscuridad y en ausencia o presencia de oxígeno. Y puede fijar nitrógeno en todas estas condiciones.

En este microorganismo la asimilación de amonio se efectúa por la vía GS-GOGAT. La actividad de la GDH no está presente (51).

Cuando Rhodopseudomonas crece en exceso de amonio, la actividad GS se encuentra muy baja y cuando la concentración de amonio en el medio disminuye o en condiciones de fijación de nitrógeno la actividad de GS se eleva considerablemente (52). La GS de este microorganismo se regula por el sistema de adenilación, encontrándose muy adenilada cuando crece en exceso de amonio. Se ha reportado que la adenilación de la GS en este microorganismo no sólo está regulada por la disponibilidad de amonio, sino también por la intensidad de la luz (53). Ya que cuando Rhodopseudomonas crece en glutamato como fuente de nitrógeno, la adenilación decrece conforme se aumenta la intensidad luminosa y si las células se someten a un cambio brusco en la intensidad de la luz, bajándola drásticamente, la GS se adenila rápidamente. Estos efectos en la modificación de la GS producidos por la luminosidad, se interpretan como un reflejo del estado energético celular, producido por la fotofosforilación (53). Es interesante señalar que en este microorganismo, la síntesis de la nitrogenasa también está influenciada por la intensidad luminosa, principalmente durante el crecimiento en glutamato (54).

El gene que codifica para la GS de Rhodopseudomonas, ha sido clonado por complementación de mutantes Gln^- de Escherichia coli, deletadas de este gene (55). El gen de GS está contenido en un fragmento de DNA de 2Kb, el cual complementa también la auxotrofia por glutamina de las mutantes en GS reportadas en Rhodopseudomonas.

Es importante mencionar que todas las mutantes en GS descritas en este microorganismo, presentan un fenotipo Nif constitutivo, es decir que tienen desreprimida la síntesis de nitrogenasa en todas las condiciones de cultivo, aun en exceso de amonio. Cuando estas mutantes se complementan con el gen estruc-

tural de la GS, se recupera la regulación de la nitrogenasa en amonio (55). Cuando se agrega un exceso de amonio, se induce la inactivación reversible de la actividad de fijación de nitrógeno. Este mecanismo involucra la ADP-ribosilación de un residuo de arginina específico de la nitrogenasa reductasa. Se propone que la glutamina o un metabolito producto de la glutamina, es el elemento que induce la represión de los genes nif, ya que se ha visto que si las mutantes Nif constitutivas se crecen en 20 mM de glutamina, la nitrogenasa se encuentra reprimida. Además el hecho de que el inhibidor de la GS, metionina sulfoximina, abata la inhibición de la nitrogenasa por amonio en las cepas silvestres, apoya la idea de que la GS catalíticamente activa o que la glutamina es el efector del sistema de inactivación de la nitrogenasa (56). Se ha sugerido que en Rhodopseudomonas la regulación por nitrógeno difiere del sistema Ntr de Klebsiella y E.coli, y que las proteínas codificadas por ntrC y ntrA no funcionan en este microorganismo (56). No se ha encontrado homología de los genes ntrA, ntrB y ntrC de Klebsiella con DNA de Rhodopseudomonas.

En cuanto a la fijación de nitrógeno, se han identificado una gran cantidad de genes nif, aproximadamente 16, los cuales se localizan en cuatro diferentes regiones del cromosoma. Los operones nif de Rhodopseudomonas parecen estar dispersos entre DNA que no codifica para genes nif (57). Se ha reportado que en Rhodopseudomonas capsulata existen varias copias de los genes que codifican para la nitrogenasa reductasa (58). Las cuales podrían funcionar en diferentes condiciones ambientales. Ya que al aislar revertantes de mutantes Nif⁻, se ha encontrado que son capaces de fijar nitrógeno, reteniendo la mutación original (58).

En cuanto a la regulación de la nitrogenasa, como se mencionó, se sabe que se induce en condiciones de limitación de amonio. Se propone que la regulación de la fijación de nitrógeno está ligada a la glutamino sintetasa (55, 56). Se ha descrito que el gen nifA se encuentra duplicado y que sólo una copia es importante para desreprimir a la nitrogenasa (59).

Azospirillum

Azospirillum es una bacteria diazotrófica que ha sido aislada de la rizosfera de pastos, plantas monocotiledoneas y dicotiledoneas, siendo las principales maíz y trigo. Este microorganismo entra en asociación con las plantas. En algunos casos se ha aislado de raíces cuya superficie ha sido esterilizada. No forma ningún tipo de estructura diferenciada, pero sí se ha visto que invade los tejidos corticales y vasculares del huésped (60).

Cuando se aisló por primera vez a esta bacteria se le clasificó en un nuevo género, Azospirillum al cual pertenecen cuatro especies diferentes, todas ellas son bacterias GRAM

negativas, muy móviles, tienen un flagelo polar, se enquistan cuando el cultivo envejece y contienen glóbulos de poli- β -hidroxibutirato. Son bacterias capaces de utilizar ácidos orgánicos (malato y succinato) como fuentes de carbono y de efectuar todos los pasos del ciclo del nitrógeno excepto nitrificación. La capacidad de fijar nitrógeno sólo se expresa en condiciones de limitación de amonio y de microaerofilia (61). Se ha reportado que Azospirillum provoca un aumento en el crecimiento de las raíces laterales y de los pelos radiculares de las plantas a las que se asocia. Esta proliferación va acompañada de un aumento en la capacidad de tomar agua y minerales del suelo, lo cual provoca un aumento en el crecimiento de la planta. Existe controversia en cuanto a la participación de Azospirillum en el metabolismo nitrogenado de la planta. Se propone que Azospirillum beneficia más a la planta por su participación en la producción de fitohormonas que por la fijación de nitrógeno (62).

En cuanto a la asimilación de amonio se ha descrito la presencia de las enzimas GDH, GOGAT y GS. Se ha reportado que la actividad de la GS decrece y la de GDH aumenta en las células crecidas en amonio y que esta relación se invierte cuando se crecen en nitrógeno molecular. Estos datos llevaron a la proposición de que en Azospirillum la ruta de asimilación de amonio varía dependiendo de la disponibilidad de amonio en el medio. De tal manera que en bajas concentraciones de amonio o en N_2 el ciclo GS-GOGAT es el que predomina y en altas concentraciones de amonio opera la vía de GDH (63).

Recientemente se ha reportado la purificación de la GDH de Azospirillum, la cual tiene algunas propiedades diferentes a las GDH de otras bacterias. Es una enzima sensible al frío, perdiendo el 80% de la actividad al incubarse 1h a 0°C. Esta inactivación por frío es irreversible. Es una enzima que puede utilizar NADPH o NADH como cofactor. Tiene un peso molecular de 280,000 y esta compuesta de seis subunidades de 48,000. Presenta dos sitios de unión para amonio, los autores de este trabajo proponen que un sitio de unión a amonio es de alta afinidad y el otro es de baja afinidad, lo cual permite a la bacteria asimilar amonio desde bajas concentraciones de amonio hasta muy altas (64), dándole así un papel muy importante a la GDH en la asimilación de amonio. Pero este reporte entra en controversia con un trabajo publicado posteriormente por Meeks et. al. En donde con experimentos realizados con $^{15}NH_4$, demuestra que la vía GS-GOGAT es la ruta principal de asimilación de amonio en Azospirillum, ya sea en condiciones de exceso o de limitación de amonio y que la GDH tiene un papel casi nulo en la síntesis de glutamato. Esta conclusión se deriva del dato de que cuando inhiben a la GS o a la GOGAT se abate completamente la incorporación del amonio marcado en cualquiera de las dos condiciones mencionadas (65).

En Azospirillum han sido aisladas mutantes en la actividad de GOGAT, las cuales pueden seguir creciendo en amonio como fuente de nitrógeno. Este dato parece favorecer a la idea de las dos vías de asimilación de amonio en Azospirillum pero en realidad estas mutantes son pleiotrópicas presentando incapacidad

de crecer en nitrato, en nitrógeno atmosférico y en fuentes orgánicas de nitrógeno incluyendo glutamato (66). Además estas mutantes tienen reprimida la síntesis de GS y de nitrogenasa, lo cual implica alguna alteración regulatoria, complicando el análisis de la asimilación de amonio en esta mutante y de la participación de la vía GDH.

En cuanto a la GS se sabe que es una enzima con características similares a las GS de enterobacterias, presenta también regulación postraduccional por adenilación (67). El gen que codifica para la GS ha sido clonado y secuenciado, encontrándose que codifica para un polipéptido de peso molecular aproximado de 51,000 (68). No se encontró homología entre el promotor de la GS de *Azospirillum* y los promotores regulados por el sistema Ntr. Este dato sugiere que esta enzima no está regulada por las proteínas NtrC y NtrA, como es el caso de la GS de *Azotobacter*.

El análisis de los transcritos que hibridizan con *glnA*, ha demostrado que en algunos casos la GS se transcribe junto con otro gen. Análisis de la secuencia de la región 5' del *glnA*, sugiere la presencia del gen *glnB*, que codifica para la proteína pII (69) (Fig. 5). El gen *glnB* también se ha encontrado unido a *glnA* de *Rhizobium leguminosarum* (70).

Azospirillum = presenta asociación con plantas.

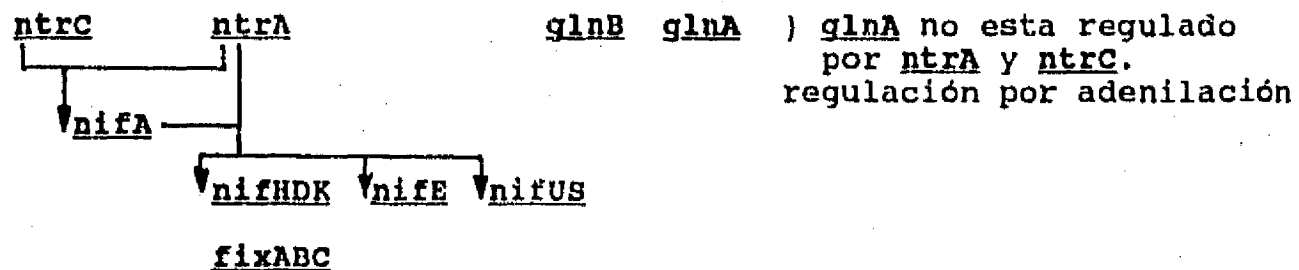


Figura 5.- Modelo de la regulación de la asimilación de amonio y de la fijación de nitrógeno en *Azospirillum*.

En cuanto a la organización de los genes de fijación de nitrógeno y a su regulación, se ha reportado la clonación de los genes estructurales de la nitrogenasa por homología con los genes *nifHDK* de *Klebsiella* (71), también se ha encontrado el gene *NifE* (67) y el de *nifA* (69). La nitrogenasa se induce en condiciones de limitación de amonio y en microaerofilia. Se han aislado mutantes en los genes *nifA* y *ntrC*, que pueden ser complementadas con los genes de *Klebsiella*, se propone que existe un control semejante al de *Klebsiella* para inducir la expresión de la nitrogenasa (72) (Fig.5).

Por último quisiera mencionar que se ha aislado una región de DNA, que presenta homología con la región *fixABC* de *Bradyrhizobium japonicum*. Estos genes están relacionados con la fijación simbiótica de nitrógeno. Mutantes de *Azospirillum* afec-

tadas en estos genes presentan un fenotipo alterado en la fijación de nitrógeno (69).

De esta manera hemos visto que en Azospirillum se presenta una regulación independiente de la GS y de la fijación de nitrógeno, a semejanza de lo encontrado en Azotobacter. También vimos que es un microorganismo que tiene cierta relación con plantas y encontramos la presencia de genes fix, indispensables para la fijación de nitrógeno en bacterias que entran en simbiosis.

Anabaena

Anabaena es una cianobacteria, un procariote fotosintético que tiene la capacidad de fijar nitrógeno. A esta cianobacteria se le puede encontrar en vida libre o como simbiote con diferentes plantas como líquenes, algunas cicadaceas, el helecho Azolla y la angiosperma Gunnera, en donde establece una asociación simbiótica exportando el amonio producto de la fijación de nitrógeno y la planta le provee de carbono (73).

Cuando este microorganismo crece en ausencia de una fuente orgánica o combinada de nitrógeno, algunas células del filamento presentan diferenciación a heteroquistes, esta diferenciación se da a intervalos regulares de aproximadamente diez células. Los heteroquistes son células que no se dividen y que proveen del ambiente microaeróbico necesario para que opere la nitrogenasa. Presentan una cubierta formada por tres capas, una capa gruesa fibrosa cuya composición no ha sido reportada, una capa homogénea formada por una red de oligosacáridos y una capa laminada compuesta de glicolípidos (73). Los heteroquistes son metabólicamente dependientes de las células vegetativas, ya que carecen del fotosistema II y de la Ribulosa 1-5difosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), Por lo tanto requieren de las células vegetativas para que las provean de carbono (73).

El metabolismo de nitrógeno en los heteroquistes es muy diferente al de las células vegetativas. También existen diferencias entre el filamento de cianobacterias en vida libre y en simbiosis.

La asimilación de amonio en Anabaena se realiza por la vía GS-GOGAT. Los heteroquistes tienen una mayor actividad de GS y una menor actividad de GOGAT que las células vegetativas. Se ha reportado que en vida libre el amonio producido por la nitrogenasa en los heteroquistes es asimilado en glutamina y que esta glutamina es exportada a las células vegetativas, en donde mediante la acción de GOGAT es convertida a glutamato. Así los heteroquistes importan glutamato para la síntesis de glutamina (Fig. 6). Los heteroquistes también importan esqueletos de carbono, principalmente malato, de donde obtienen energía para la fijación de nitrógeno y para la asimilación de amonio (73).

La GOGAT de Anabaena es una enzima que requiere ferredoxina como cofactor (74).

producido por la nitrogenasa, no puede ser asimilado en el heteroquiste y es excretado a la planta en donde es asimilado por las enzimas vegetales GS y GOGAT (78).

En cuanto a la regulación de la fijación de nitrógeno, Anabaena es el único procarionte en donde participan rearrreglos en el genoma durante este proceso. Existen dos rearrreglos de los genes de fijación de nitrógeno, ambos están acoplados a la diferenciación del heteroquiste (79). En Anabaena se ha reportado la existencia de varios genes nif, entre ellos nifD, nifH, nifK y nifS. Se ha visto que nifH y nifD se localizan adyacentes y que a diferencia de Klebsiella nifK se encuentra separado de nifD por unas 11Kb. Mientras que nifS se localiza en el extremo 5' de nifH. Cuando ocurre la diferenciación a heteroquiste, se presentan dos rearrreglos. El primero acerca a nifK con nifD con la exición del fragmento de 11 Kb que los separaba, dando como resultado la formación del operón NifHDK y el segundo acerca a NifS con otra parte del genoma (79).

El rearrreglo de NifD involucra la recombinación sitio específica entre dos secuencias repetidas de 11pb. Este rearrreglo es muy interesante ya que una de las secuencias repetidas de 11pb se localiza a 330 bases del extremo 5' del gene NifK y la otra está dentro del gene NifD. De tal manera que en este rearrreglo se substituyen 27 aminoácidos del gene Nif D, por 43 aminoácidos codificados en una secuencia de DNA que se localizaba a 11 Kb de distancia. La secuencia rearrreglada es muy homóloga a la secuencia de NifD de Rhizobium, mientras que la de la célula vegetativa no presenta homología (79).

Frankia

Frankia es un actinomiceto capaz de fijar nitrógeno, que efectúa simbiosis con algunos árboles. La infección de la planta por esta bacteria filamentosa se puede dar por deformación de la raíz e invasión o por penetración de la epidermis por los espacios intercelulares y penetración de las células corticales. Dentro de las células corticales, la bacteria se diferencia en filamentos ramificados los cuales terminan en vesículas. Es en estas vesículas en donde se expresa la nitrogenasa (80).

En Frankia la asimilación de amonio procede por la vía GS-GOGAT. Se ha reportado la presencia de dos GS, en donde la GS II es muy parecida a la GS II de Rhizobium en su secuencia nucleotídica (81). La GS I se encuentra presente cuando las células se crecen en amonio, pero se encuentra ausente en condiciones de fijación de nitrógeno. En cambio la GS II se encuentra muy elevada en condiciones de fijación de nitrógeno en vida libre y en las vesículas aisladas de las plantas. La GOGAT es una enzima dependiente de NADH, se encuentra presente en condiciones de exceso y limitación de amonio en la hypha, pero es indetectable en las vesículas (81). La ausencia de GOGAT en las

vesículas ha llevado a la propocisión de que la asimilación de amonio esta bloqueada en simbiosis, debido a una limitacion de substrato para que actue la GSII.

En cuanto a la fijación de nitrógeno se conoce muy poco respecto a la estructura y regulación de los genes nif. Se han aislado los genes que codifican para la nitrogenasa reductasa. Los genes nifH y nifD estan contiguos. También se ha identificado a nifK y a nifA. Se ha secuenciado a nifH y se ha visto que las secuencias nucleotídica y de aminoácidos son muy parecidas a la secuencias de Anabaena, R.meliloti y K.pneumoniae (82).

Rhizobium

Las bacterias del género Rhizobium establecen asociaciones simbióticas con especies vegetales de la familia leguminosas. Rhizobium ha sido agrupado dentro de la familia Rhizobiaceae, cuyas características globales comprenden a otras bacterias aeróbicas, GRAM negativas, móviles presentando ya sea un flagelo polar o subpolar o bien de dos a seis flagelos. Estas bacterias interaccionan con las raíces de las plantas leguminosas para formar nódulos en los que se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. Para que se forme un nódulo es necesario que exista un reconocimiento específico entre la bacteria y la planta y que Rhizobium penetre por los pelos radiculares hasta la corteza de la raíz, donde pasa a través de la pared celular, quedando englobado en vesículas membranosas dentro del citoplasma vegetal (83). En la formación del nódulo existe una marcada proliferación de las células de la corteza radicular y un proceso de diferenciación de ambos participantes. El Rhizobium sufre cambios morfológicos y metabólicos. Se hace más grande y de forma irregular, esta forma se conoce como bacteroide y es este el que se encarga de la fijación de nitrógeno atmosférico. Los bacteroides no se dividen y presentan grandes cambios en su metabolismo de carbono y de nitrógeno como se vera más adelante.

Las diferentes cepas de Rhizobium se han clasificado en tres géneros, Rhizobium, Bradyrhizobium y Azorhizobium. Este ultimo presenta características muy especiales, ya que es capaz de inducir nódulos en las raíces y en los tallos de Sesbania rostrata. La nodulación en los tallos es muy abundante e insensible a la presencia de nitrógeno combinado en el suelo (84). Por otra parte Azorhizobium es capaz de fijar nitrógeno en vida libre y de crecer con este nitrógeno.

La asimilación de amonio en Rhizobium procede únicamente por la vía GS-GOGAT, la actividad de GDH esta ausente o es muy baja (85), encontrándose que el papel de la GDH es nulo en la asimilación de amonio en Rhizobium. Todas las mutantes auxótrofas de glutamato reportadas estan afectadas en la ac-

tividad de glutamato sintasa y ninguna presenta alteración en la GDH (86,87,88,89,90). De las mutantes en GOGAT reportadas las de Azorhizobium caulinodans y B. japonicum presentan un fenotipo Fix^- y las de R. meliloti y la de R. sp 32H1 presentan fenotipo Fix^+ . El gene que codifica para la GOGAT ha sido aislado en Azorhizobium caulinodans (91) y en Rhizobium sp (92), en ambos casos se ha visto que el gene glt es independiente del sistema de regulación general de nitrógeno Ntr.

En cuanto a la GS se sabe que Rhizobium posee dos GSs las cuales se han caracterizado por su diferente migración electroforética y por su diferente peso molecular, siendo la GS I mayor que la GS II (93). Únicamente en Azorhizobium caulinodans se ha reportado la ausencia de GSII (84,86). Recientemente ha habido controversia en cuanto al número de GS que poseen las Rhizobaceas, ya que hay grupos que han reportado la purificación de tres formas de GS, utilizando columnas de DEAE-celulosa (94). Además otros grupos han encontrado tres genes que codifican para GS (95,96). El tercer gen descrito para GS, lo aislaron por complementación de mutantes Gln^- de Klebsiella y de E. coli, pero no se expresa en Rhizobium. Se ha propuesto que este es un gen críptico en Rhizobium.

La GS I es muy parecida a la GS de enterobacterias en relación a su estructura oligomérica de dodecámero, en su secuencia nucleotídica (97) y de aminoácidos (98) y en su regulación post-traducciona por el sistema de adenilación (85,86). La GS I se transcribe constitutivamente de un sólo promotor bajo diferentes condiciones de cultivo (98,99). El promotor de la GSI presenta una estructura muy similar a la secuencia consenso -35, -10 de los promotores de enterobacterias (99). A diferencia de lo encontrado en Klebsiella y E. coli, en donde glnA presenta dos promotores, el promotor p_1 tiene el consenso -35, -10 y el promotor p_2 es semejante a los promotores regulados por ntrA, con la estructura característica de -26, -10. Así la GSI de este microorganismo no está regulada por el sistema general de nitrógeno. Las mutantes en los genes ntrA y ntrC descritas no presentan modificación en cuanto a los niveles de inducción de la GSI. Las mutantes estructurales en el gen de GSI (glnA), descritas en R. meliloti, crecen bien en amonio como fuente de nitrógeno, utilizando la actividad de la GS II, y presentan un fenotipo Nif^+ , Fix^+ (97). Mientras que las mutantes en GSI de Azorhizobium caulinodans resultan en un fenotipo Asm^- (debido a la ausencia de actividad de GSII) y son Nif^- Fix^- . Este dato ha llevado a la proposición de que el establecimiento de nódulos efectivos para la fijación de nitrógeno, requiere de una asimilación de amonio eficiente (84).

En cuanto a la GSII se sabe que es una enzima muy diferente de las GS_s reportadas en otros procariotes, en relación a su estructura, a reacciones de inmunoprecipitación y en que no se regula por el sistema de adenilación. La GS II tiene un peso molecular menor que el de la GSI, se calcula que el peso molecular de cada subunidad de la GSII de Bradyrhizobium

japonicum es de 36,000 mientras que la GSI tiene subunidades de 59,000 (85,102). En cuanto a la estructura de la GSII se ha propuesto que es un pentámero (85), aunque también se ha sugerido que presenta una estructura de octámero (102). La GSII es una proteína termosensible, perdiendo su actividad cuando se incuba en altas temperaturas, la vida media a 50°C es de 33 min. en B.japonicum (103), de 10 min. en R.fredi (85), de 13 min. en R.trifoli (103).

Se ha propuesto que la GSII es una enzima de origen eucariótico. Sugiriendo que la planta fue la fuente de donde Rhizobium obtuvo el gen que codifica para esta enzima. Esta proposición se basa en el dato de la secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la secuencia nucleotídica, es 47% homóloga a la secuencia de la GS de plantas (102). Esta proposición abre muchas preguntas acerca del fenómeno de transferencia genética de eucariotes a procariotes. Se ha reportado que la GSII de Frankia es muy parecida a la GS II de Rhizobium (81). Estos dos microorganismos establecen simbiosis con las plantas, infectando las células corticales, en donde se diferencian para convertirse en organismos especializados para la fijación de nitrógeno. Sería interesante preguntar si el hecho de infectar las células corticales fue el punto de contacto que favoreció la transferencia genética de eucariotes a procariotes. Así como cuál fue el fin o el motivo de esta transferencia genética, o si la GSII es indispensable para la fijación de nitrógeno.

La GSII es una enzima que tiene un respuesta muy grande a la disponibilidad de nitrógeno en el medio ambiente. Se ha reportado que la actividad de GSII decrece al agregar un exceso de amonio al medio de cultivo (85,102,104,105). Esta enzima no es susceptible a inactivación por adenilación.

La actividad de GSII se induce en condiciones de limitación de amonio (99). En Bradyrhizobium japonicum se ha encontrado que la regulación de esta enzima se da a nivel de transcripción (99) y que el gene de GSII presenta un promotor muy semejante al de los genes nifH, nifDK y nifB, presentando la secuencia consenso de -26,-8, de los promotores que son activados por la RNA polimerasa unida al factor σ codificado por ntrA. Además se ha encontrado una secuencia en -103,-119 semejante a la secuencia consenso a la cual se une NR_T (el producto de ntrC) (99). Por lo que se propone que la GSII de Rhizobium está regulada por el sistema de control Ntr, que reacciona a la disponibilidad de nitrógeno en el medio ambiente. Mutantes en el gen ntrC reportadas en R.meliloti (95) y B.japonicum (106), han confirmado esta proposición ya que carecen de actividad de GSII.

Las mutantes estructurales en el gen glnII descritas en R.meliloti (101) y en B.japonicum (99) son protótrofas para glutamina, son capaces de crecer en nitrato como fuente de nitrógeno y nodulan efectivamente. En cambio las dobles mutantes glnA⁻glnII⁻ descritas tienen fenotipos contrarios, ya que en Bradyrhizobium se ha reportado que resultan en un fenotipo Asm^- Nod^- Fix^- y en Rhizobium meliloti presentan un fenotipo Fix^-

Se ha propuesto que la asimilación de amonio en los bacteroides esta reprimida, ya que la GSI se encuentra adenilada mientras que la actividad de GSII es indetectable (107,108), de tal manera que el nitrógeno que fija el bacteroide no es asimilado y es excretado a la célula vegetal (109). En B. japonicum se reportó que la actividad de la GSII decrece en condiciones de microaerofilia (110). Por lo que la ausencia de actividad de GSII en los bacteroides podría deberse a las condiciones microaeróbicas del nódulo. Recientemente Adams y Chelm publicaron que sí existe transcripción del gen glnII en bacteroides de Bradyrhizobium japonicum aislados de nódulos, así como en bacterias crecidas en condiciones de microaerofilia, por lo que estos autores proponen que si la GSII no esta activa en estas condiciones, es posible que se deba a que esta enzima este regulada por algún mecanismo post-transcripcional desconocido (111).

El gen que codifica para NR_1 ha sido aislado en R. meliloti (101), en Azorhizobium caulinodans (100) y en Bradyrhizobium japonicum (106), por homología con el gen ntrC de Escherichia coli. Mutantes en este gen presentan incapacidad de crecer en nitrato como fuente de nitrógeno. Estas mutantes no presentan cambios en la regulación de la inducción de la GSI y son incapaces de expresar actividad de GSII, tal como se había descrito para las mutantes ntrC⁻ de Agrobacterium las cuales tampoco expresan la actividad de GSII (112).

Respecto al gen de ntrA se ha reportado su clonación en R. meliloti (113), mutantes en este gen son incapaces de crecer en nitrato, estan afectadas en el transporte de ácidos dicarboxílicos y en la activación de los operones nif en condiciones explanta y en el estado simbiótico, por lo que son Nif^- Fix⁻.

En relación a la fijación de nitrógeno se ha encontrado que en algunas especies de Rhizobium los genes nif se encuentran en plásmidos grandes, mientras que en Bradyrhizobium se encuentran en el cromosoma. Los genes estructurales de la nitrogenasa nifHDK son muy conservados entre las diferentes especies de Rhizobium. En algunos tipos de Rhizobium estos genes se encuentran reiterados, encontrándose activas las diferentes copias, de tal manera que para tener mutantes estructurales en la nitrogenasa se requiere mutar todas las copias (114).

En cuanto a la regulación de los genes nif se sabe que los productos de nifA y ntrA son indispensables para inducir la expresión de los genes nif. Es importante mencionar que en Rhizobium al igual que en Klebsiella, Azotobacter y Anabaena el promotor de nifH tiene la secuencia consenso reconocida por el factor σ de la RNA polimerasa codificado por ntrA y que en todos estos microorganismos incluyendo además a Azospirillum y a

Frankia, la transcripción a partir de nifH también depende de la presencia del producto de nifA.

En R. meliloti el producto de ntrC sólo se requiere para la expresión de los genes nif explanta, ya que mutantes en este gene no fijan nitrógeno en cultivo y si en simbiosis (101). El producto de nifA es indispensable para la expresión de la fijación de nitrógeno en simbiosis (101). Se podría sugerir que en Rhizobium se presentan dos diferentes vías para regular la expresión de la fijación de nitrógeno, dependiendo si la bacteria se encuentra en estado simbiótico o en vida libre.

Se ha reportado que el producto de nifA es sensible a oxígeno (115) y que la expresión de nifA se induce en condiciones microaeróbicas (116), a diferencia de Klebsiella en donde el producto de nifL es el que es sensible a oxígeno y nifA no presenta ninguna modificación por oxígeno.

En Rhizobium meliloti se ha propuesto un modelo de regulación de cascada para la inducción de los genes nif y fix. En este modelo se propone que cuando se tienen condiciones de microaerobiosis, se induce la expresión de nifA y de fixN. La regulación de estos genes es dependiente de los genes fixLJ. Así fixLJ activan la transcripción del promotor de nifA y nifA a su vez activa la transcripción de los otros promotores nif y fix. Así los productos de los genes fixLJ substituyen a los de los genes ntrBC en la inducción de la función Nif (Fig.-7). El análisis de la secuencia de fixLJ ha mostrado que estos genes presentan homología con los sistemas regulatorios de procariotes (sensor/regulador) (117).

Por otro lado Azorhizobium caulinodans presenta una situación especial, ya que como se mencionó, esta bacteria es capaz de crecer en condiciones de fijación de nitrógeno y asimilar el amonio producido por la nitrogenasa. En Klebsiella se ha encontrado una coordinación en la regulación de los genes involucrados en fijación de nitrógeno y los de asimilación de amonio, mediante el sistema Ntr. En A. caulinodans no parece ser el caso, ya que mutantes ntrC⁻, presentan regulación silvestre de GSI y de GOGAT (100). Además esta mutante presenta una fijación de nitrógeno en vida libre de sólo el 10% de la cepa silvestre y tienen un fenotipo Fix retardado. La expresión de NifA en las mutantes ntrC⁻ de A. caulinodans sólo se reduce a la mitad. Se ha sugerido que existe otro gen que controla la expresión de nifA, ya que las mutantes ntrC⁻ siguen respondiendo en la expresión de nifA, a la presencia de amonio en el medio. Así se ha propuesto que los productos de los genes ntrYX están involucrados en la regulación de nifA (84).

Por último quisiera comentar acerca de la fuente de carbono que utiliza el simbiote para satisfacer la demanda de energía tan grande para la conversión de N₂ en amonio. En base a que los bacteroides no metabolizan glucosa y si ácidos dicarboxílicos, se ha propuesto que el succinato u otro ácido dicarboxílico es la fuente de carbono que la planta da al bacteroide. Se han aislado mutantes en el transporte de succinato que resultaron ser incapaces de fijar nitrógeno (118), lo mismo que mutantes en la succinato deshidrogenasa (119). Se ha demostrado que el succinato

es metabolizado a glutamato en los bacteroides (120) lo cual ha llevado a la proposición de que el glutamato es un sustrato respiratorio en los bacteroides (121), encontrándose que mutantes que no degradan glutamato son Fix^- (122). El análisis más detallado de esta proposición servirá para entender más acerca de la interacción planta-bacteria en el nódulo.

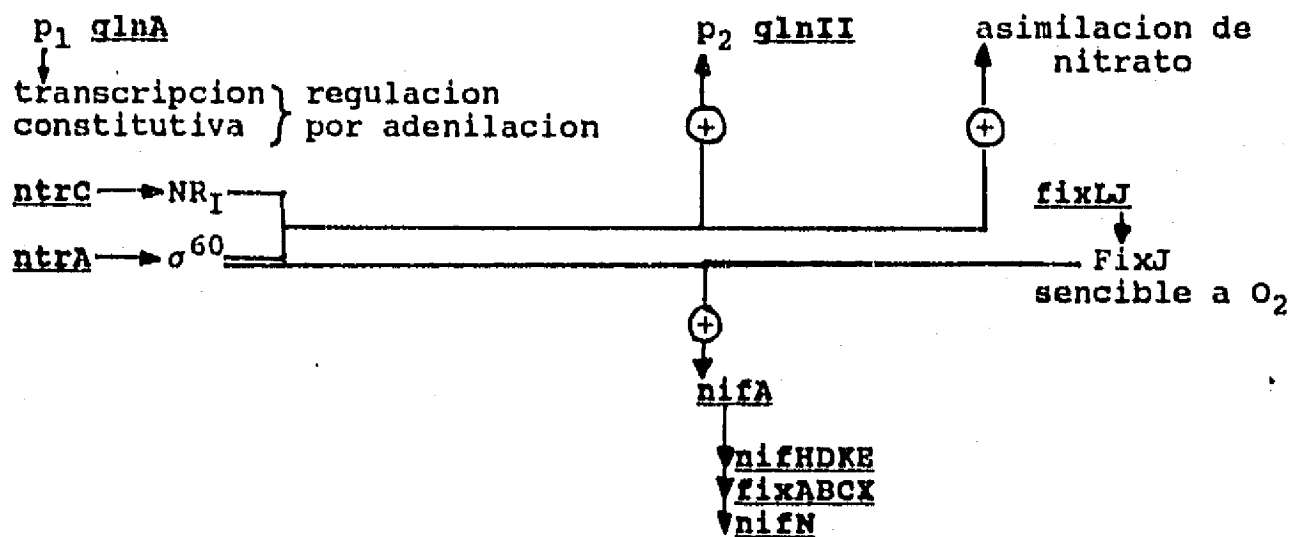


Figura 7.- Modelo de regulación de la asimilación de amonio y la fijación de nitrógeno en Rhizobium meliloti.

OBJETIVOS

En esta revisión hemos visto los diferentes mecanismos que tienen las bacterias fijadoras de nitrógeno para regular este proceso y acoplarlo al de asimilación de amonio.

En Klebsiella se ha visto que estos dos procesos están acoplados y finamente regulados por un sistema de cascada en el cual participan diferentes proteínas regulatorias, codificadas por genes ntr y gln y que la señal para inducir la expresión de la fijación de nitrógeno está dada por cambios en las pozas intracelulares de α -cetoglutarato y glutamina. La glutamino sintetasa, la glutamato deshidrogenasa así como los genes nif están regulados por el sistema general de nitrógeno (Ntr).

En los demás microorganismos presentados en esta revisión se encuentran variaciones de este modelo de regulación. Podemos decir que en ninguna otra bacteria se presenta una regulación idéntica a la presentada por Klebsiella.

Así por ejemplo en Azotobacter, que es otra bacteria diazotrófica, la glutamino sintetasa no está regulada por el sistema Ntr, sin embargo la GS de este microorganismo es muy parecida a la de Klebsiella, en su estructura y en su regulación por adenilación. En cuanto a los genes nif, esta bacteria presenta tres nitrogenasas y solo una de ellas está regulada por el sistema Ntr. Para inducir la expresión de las otras dos nitrogenasas se ha descrito la presencia de un nuevo gen regulatorio (nfrX).

En las bacterias que establecen relación con las plantas (Azospirillum, Anabaena, Frankia y Rhizobium) la regulación de estos procesos también presenta grandes diferencias a lo reportado en Klebsiella. Ya que por ejemplo se ha descrito la existencia de otros genes que son indispensables en el proceso de fijación de nitrógeno en condiciones simbióticas, como los genes fix descritos en Azospirillum y en Rhizobium. Por otro lado la interacción con plantas involucra el intercambio de señales regulatorias entre la planta y la bacteria. En algunos microorganismos (Anabaena y Frankia) la asimilación de amonio se bloquea cuando entra en simbiosis con la planta, cosa que no ocurre cuando fijan nitrógeno en vida libre.

Rhizobium es una bacteria que interacciona con las plantas leguminosas, en este microorganismo la regulación de la fijación de nitrógeno y la de la asimilación de amonio presentan muchas peculiaridades. Primero que en el proceso de asimilación de amonio, participan dos glutamino sintetasas. La GSI es muy

parecida a la GS de Klebsiella, en cuanto a su estructura y su regulación postraducciona, pero a semejanza de la GS de Azotobacter y Azospirillum, esta enzima no esta regulada por el sistema Ntr. La GSII es una enzima muy parecida a la GS de plantas y esta regulada por el sistema Ntr. La GSII de Frankia es muy parecida a la GSII de Rhizobium. Estos dos microorganismos infectan las células corticales de la planta. En donde se diferencian para producir un organismo especializado en la fijación de nitrógeno. Seria muy interesante preguntarse si el hecho de infectar las células corticales fue el punto de contacto que favoreció la transferencia genética. Así como cual fue el motivo de de esta transferencia de información y si la GSII juega un papel importante en la diferenciación y en la simbiosis.

En cuanto a la regulación de la fijación de nitrógeno en Rhizobium, se sabe que los genes ntrA y nifA juegan un papel muy importante en la inducción de los operones nif y que ntrC no participa en la regulación de nifA en simbiosis, sino que se ha descrito la presencia de otro gen regulatorio (fixJ) encargado de inducir la expresión de nifA.

En Rhizobium la fijación de nitrógeno se induce en simbiosis en donde la bacteria se diferencia a bacteroide. Este es un proceso muy complicado que involucra la interacción con la planta, intercambio de señales para dar como resultado la formación de nódulos con bacteroides que fijen nitrógeno. El metabolismo de carbono y de nitrógeno de la bacteria juega un papel fundamental durante el desarrollo de la simbiosis y la diferenciación a bacteroide. Rhizobium debe de estar en un estado metabólico especial para responder a las señales de la planta. Así el estudio del metabolismo de carbono y nitrógeno de la bacteria en vida libre, podrá dar a conocer como responde la bacteria a diferentes estímulos. Esto nos podría llevar a simular las señales de la planta y lograr diferenciar a Rhizobium ex-planta.

Podemos decir que el amonio es una señal metabólica durante la simbiosis, ya que se ha reportado que la presencia de una fuente de nitrógeno combinado en el suelo, se suprime la nodulación. También se ha visto que el amonio reprime la expresión de los genes nod de la bacteria.

En este trabajo se presentará un estudio de la asimilación de amonio desde diferentes puntos de vista de la bacteria Rhizobium phaseoli. Esta bacteria se caracteriza por interactuar con la leguminosa Phaseolus vulgaris. En el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, existe un especial interés en estudiar a esta bacteria. Dado la importante repercusión económica que pudiera tener el mejorar esta relación simbiótica en el cultivo del frijol.

Nosotros nos preguntamos por que Rhizobium solo asimila el amonio por la vía GS-GOGAT, es esta una condición imprescindible para el establecimiento de la simbiosis efectiva. Así como que pasaría con la relación planta-bacteria si se diera un cambio en la ruta de asimilación de amonio, mediante la presencia de otra enzima que incorpore amonio, como la actividad de GDH.

Por último nos interesa saber cual es el papel que juega la

GSII en esta interacción. También el por que de la existencia de dos actividades de glutamino sintetasa en Rhizobium. En Rhizobium phaseoli se ha descrito que en la región 5' de los genes estructurales de la nitrogenasa, existe la secuencia reconocida por ntrA. En B. japonicum también se ha descrito esta secuencia antes del gen glnII. Se podría proponer que la GSII y la nitrogenasa estan sujetas a regulación positiva por el mismo sistema. Sin embargo se ha decrito que en condiciones de máxima inducción de la nitrogenasa en simbiosis, no hay actividad detectable de GSII. Sin embargo se ha reportado que es posible detectar transcrito de glnII en los bacteroides (111). Con el proposito de entender los mecanismos que pudieran regular la actividad de GSII durante la simbiosis, se estudiará la posible regulación de esta enzima por mecanismos postraduccionales. Así mismo se buscarán mutantes que afecten la actividad de GSII y se analizarán los efectos que produce la ausencia de GSII en Rhizobium phaseoli.

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo serán presentados en la forma de tres artículos. Los dos primeros han sido publicados en la revista *Journal of Bacteriology*, volumen 170 y el tercero es un manuscrito, el cual está listo para enviarse a publicación en la revista *Molecular and General Genetics*.

Los títulos de los artículos presentados son:

1.- Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. Alejandra Bravo and Jaime Mora. 1988. *Journal of bacteriology* 170 : 980-984.

2.- Introduction of the *Escherichia coli* *gdhA* gene into *Rhizobium phaseoli* : effect on nitrogen fixation. Alejandra Bravo, Baltazar Becerril and Jaime Mora. 1988. *Journal of Bacteriology* 170 : 985-988.

3.- Isolation and characterization of a Tn5 induced mutant of *Rhizobium phaseoli* affected in the GSII activity and nitrogen fixation. Alejandra Bravo, Luz María Martínez, Jorge Calderón and Jaime Mora. 1989.

Ammonium Assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the Glutamine Synthetase-Glutamate Synthase Pathway

ALEJANDRA BRAVO AND JAIME MORA*

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Received 13 July 1987/Accepted 17 November 1987

Evidence from *in vitro* and *in vivo* studies showed that in *Rhizobium phaseoli* ammonium is assimilated by the glutamine synthetase (GS)-glutamate synthase NADPH pathway. No glutamate dehydrogenase activity was detected. *R. phaseoli* has two GS enzymes, as do other rhizobia. The two GS activities are regulated on the basis of the requirement for low (GSI) or high (GSII) ammonium assimilation. When the 2-oxoglutarate/glutamine ratio decreases, GSI is adenylylated. When GSI is inactivated, GSII is induced. However, induction of GSII activity varied depending on the rate of change of this ratio. GSII was inactivated after the addition of high ammonium concentrations, when the 2-oxoglutarate/glutamine ratio decreased rapidly. Ammonium inactivation resulted in alteration of the catalytic and physical properties of GSII. GSII inactivation was not relieved by shifting of the cultures to glutamate. After GSII inactivation, ammonium was excreted into the medium. Glutamate synthase activity was inhibited by some organic acids and repressed when cells were grown with glutamate as the nitrogen source.

It is generally accepted that ammonium assimilation in rhizobia proceeds mainly through the glutamine synthetase (GS)-glutamate synthase (GOGAT) pathway (6, 13, 15, 19-21). However, in contrast with other bacteria, rhizobium contains two forms of GS, and this presents additional complexity in the study of ammonium assimilation. The GSI enzyme is similar to the enzymes found in other gram-negative bacteria in regard to its monomeric and oligomeric structure, posttranslational regulation, and amino acid sequence (5, 6, 25). The GSII enzyme has a lower molecular weight and is heat labile (6, 7, 10, 16). Recently, in *Bradyrhizobium japonicum*, the gene coding for GSII was cloned, the enzyme was purified, and it was found that its amino acid sequence more closely resembles that of plant GS than that of bacterial GS (4). The function of the two GS forms from rhizobia in the free-living state and during symbiosis remains controversial, since there are several reports about the regulation of GS in rhizobia, without distinction between the two GS activities (13, 15, 19, 20, 27).

Other studies by Darrow (6) and Ludwig (16) showed that ammonium has a strong negative modulation effect on GSII and a minor effect on GSI. GSI from free-living rhizobia (6, 16) and bacteroids (3) was mainly regulated by adenylylation. However, Howitt et al. (11) reported that, although GSII was severely repressed when rhizobia were grown on ammonium, GSI had the same biosynthetic activity, regardless of the adenylylation state of the enzyme (11).

Glutamine auxotrophs have been isolated in *Rhizobium cowpea* 32H1 and *R. meliloti* (13, 16), but the number of mutations responsible for these phenotypes remains uncertain.

Carlson et al. (5) and Somerville and Kahn (25) have isolated the GSI genes from *B. japonicum* and *R. meliloti*, respectively. The GSI gene of *B. japonicum* was constitutively transcribed in different nitrogen conditions (5). The *R. meliloti* GSI gene has been interrupted *in vitro* and used to replace the normal GSI sequence in *R. meliloti* (25). It was found that, in this mutant strain, GSII can support growth on

minimal medium with NH_4Cl as the nitrogen source. Moreover, this mutant strain was unaffected in its nodulation and nitrogen fixation of *Medicago sativa* (25).

To establish the operation and function of the enzymes that assimilate ammonium in *R. phaseoli*, it is necessary to correlate the activities found *in vitro* with *in vivo* experiments and learn how the enzymes are regulated.

We studied for the first time how ammonium is assimilated in the free-living state in *R. phaseoli*. We show here which enzymes participate *in vivo* in this process, how they are regulated, and that GSII has a function different from that of GSI.

MATERIALS AND METHODS

Strain. The *R. phaseoli* wild-type strain CFN42 was used in this study (22).

Growth conditions. Batch cultures of *R. phaseoli* were grown at 30°C and shaken at 175 rpm. For growth on minimal medium (MM; 2), cells previously grown overnight on a rich medium (PY) containing 0.5% peptone, 0.3% yeast extract, and 0.07 M CaCl_2 were washed twice and used as an inoculum after being diluted 25-fold and adjusted to an optical density of 0.05 at 540 nm. The nitrogen and carbon sources in MM were used at 10 mM. Growth was monitored by measurement of the optical density at 540 nm and by protein determination by the Lowry method.

Determination of GOGAT activity. Cell extracts were prepared by grinding whole cells in 0.1 M KCl-0.5% 2-mercaptoethanol (pH 7.6) with a Braun homogenizer and 0.1-mm (diameter) glass beads. Extracts were desalted by being passed through a Sephadex G25 column (1 by 10 cm) which was equilibrated and eluted with the extraction solution. The voided volume fractions, which contained the protein peak, were pooled and used as the enzyme source. GOGAT activity was detected by measuring the oxidation of NADPH at 340 nm. The activity was measured in a 1-ml reaction mixture containing 50 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid), 1% 2-mercaptoethanol (pH 8.5), 3.65 mM glutamine, 3 mM 2-oxoglutarate, 0.2 mM NADPH, and 0.1 ml of cell extract. Specific activity

* Corresponding author.

TABLE 1. Specific activities of ammonium assimilation enzymes in *R. phaseoli* during growth under different culture conditions

Enzyme	Sp act (U/mg of protein) ^a	
	PY	MM
GSI	25	2
GSII	ND	15
GOGAT	10	32

^a Cells were grown for 12 h on PY or MM with succinate plus NH₄Cl. GOGAT and GS specific activities were determined at 12 h of growth by the biosynthetic assay. ND, Not detected.

was expressed as units per milligram of protein; 1 U represents 1 nmol of NADPH oxidized per min.

Determination of GS activity. GSI and GSII activities were assayed with whole cells or cell extracts. Whole cells were prepared by suspension in 10 mM imidazole hydrochloride-1.0 mM MnCl₂ (pH 7.0) and permeabilized with 0.1 mg of cetyltrimethylammonium bromide per ml. Cell extracts were prepared by grinding whole cells as described above, in 10 mM imidazole hydrochloride-0.5 mM EDTA (pH 7.0).

GS was measured by its transferase and synthetase activities as described by Bender et al. (1). Specific activities were expressed as units per milligram of protein; 1 U represents 1 nmol of γ -glutamyl hydroxamate produced per min. The two GS activities were distinguished by their different heat stabilities for 1 h at 50°C (7) and their different sedimentations on sucrose density gradients as described below. The adenylation state of GSI was determined by calculation of the ratio of (transferase activities measured in the presence and absence of added Mg²⁺) as described by Shapiro and Stadtman (24).

Sucrose gradient sedimentation. Cell extracts were layered over a 5 to 20% continuous sucrose gradient and centrifuged for 3 h in an SW55 rotor at 240,000 \times g in a Beckman ultracentrifuge as previously described (6). After centrifugation, fractions were collected from the top of the tube, and GS transferase and synthetase activities were determined in each fraction. GSI and GSII were identified by heating for 1 h at 50°C.

Metabolite determination. Cell samples for amino acid analysis were suspended in 80% ethanol, boiled for 10 min, and disrupted as described above. Cell debris was removed by filtration with 0.22- μ m (pore size) Millipore membrane filters. The filtrates containing the free amino acids were lyophilized and separated with an Amisco amino acid analyzer as previously described (12).

2-Oxoglutarate was extracted by suspension of the cells in 1 ml of cold 0.3 N HClO₄-1 mM EDTA and neutralization to pH 7.0 with 0.1 ml of 1 M K₂HPO₄-0.1 ml of 10 M KOH. 2-Oxoglutarate was determined in the clear supernatant obtained after centrifugation by measurement of the initial rate of optical density change at 340 nm with 1:40 diluted bovine glutamate dehydrogenase (GDH) as previously described (26).

Samples of the medium were collected, and ammonium was measured with an Orion (Cambridge, Mass.) electrode as previously reported (8).

RESULTS

Growth and ammonium assimilation enzymes. The activities of GSI, GSII, and GOGAT were measured in *R. phaseoli* grown on PY or MM. All of the cell nitrogen

incorporated on MM (succinate plus NH₄Cl) comes from ammonium assimilation, in contrast to what occurs on PY. The enzyme activities found in each medium are presented in Table 1. GSI biosynthetic activity was present on PY and almost absent on MM. In contrast, GSII was present on MM and was not detected on PY medium. GOGAT activity was higher on MM than on PY, and no GDH activity was detected even in 100-fold-concentrated cell extracts with six different extraction buffers in cells grown on different carbon and nitrogen sources.

GOGAT activity required NADPH as a cofactor. Azaserine or L-methionine sulfone inhibited all GOGAT activity in vitro (3a). As reported for GSII from other rhizobia, this enzyme is thermolabile (7, 10, 16) and was inhibited by methionine sulfoximine (data not shown).

R. phaseoli growth inhibition by 5 mM L-methionine sulfone and its reversal by added glutamate indicate that GS-GOGAT is the only pathway for ammonium assimilation in this organism.

The time courses of GSI and GSII activities were monitored on MM with glutamate as the nitrogen source, with which *R. phaseoli* grew with a 3-h doubling time similar to that obtained with ammonium (Fig. 1A). GSI adenylation increased during exponential growth (Fig. 1A) and, as a consequence, the biosynthetic activity of this enzyme was very low after 12 h of growth (Fig. 1B); however, the transferase activity was high and constant (Fig. 1C). In contrast, GSII transferase and synthetase activities increased from nondetectable to very high levels during exponential growth and started decreasing, before reaching the stationary phase, to undetectable values after 24 h of incubation (Fig. 1B and C). This regulatory pattern of GS was also observed in four other strains of *R. phaseoli* (data not shown).

We also found that these different activities of GSI and GSII during growth on MM correspond to the peak sizes expected for GSI and GSII when they are sedimented in sucrose gradients. The larger GSI sedimented faster than the smaller GSII (Fig. 2A).

GS and GOGAT activities under different nitrogen conditions. Transferase and synthetase GSII activities in MM depend on the nitrogen source present in the medium (Table 2). The highest levels of GSII activity were found in cells

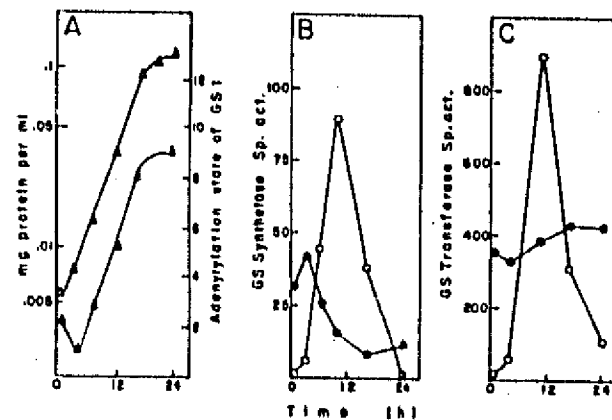


FIG. 1. GSI and GSII specific activities during growth of *R. phaseoli* on MM supplemented with succinate and glutamate as carbon and nitrogen sources. Panels: A, growth curve of *R. phaseoli* CFN42 on this medium (Δ) and adenylation state of GSI activity during growth (\blacktriangle); B, synthetase assays of GSI (\bullet) and GSII (\circ); C, transferase assays of GSI (\bullet) and GSII (\circ).

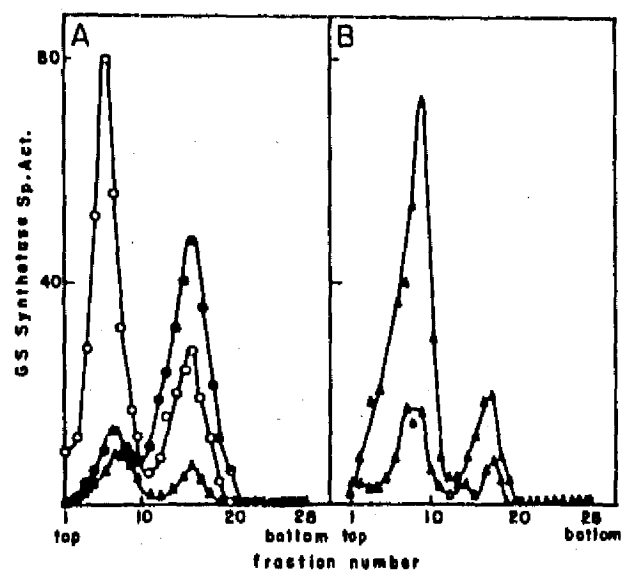


FIG. 2. Sedimentation on sucrose density gradients of GSI and GSII from cell extracts of *R. phaseoli*. Panels: A, cell extracts from cultures grown with glutamate as the nitrogen source for 4 (●), 12 (○), and 24 h (△); B, cell extracts from cultures grown for 10 h with glutamate as the nitrogen source (▲) and at 3 h after ammonium addition to the medium (△).

grown in nitrate and glutamate; these were four- and sixfold higher than those in glutamine and ammonium, respectively.

GSI activities were similar with all of the nitrogen sources tested. GSI biosynthetic activity was from 4- to 10-fold lower with ammonium and glutamine and 20-fold lower with nitrate and glutamate than was GSII biosynthetic activity under similar nitrogen conditions (Table 2).

GSI and GSII activities varied during growth on MM, and a correlation was established with the 2-oxoglutarate and glutamine contents. 2-Oxoglutarate was higher in PY and decreased to different levels in MM with different nitrogen sources. 2-Oxoglutarate decreased to very low levels after cells were transferred from PY to ammonium or glutamine (Fig. 3A), in which low GSII activity was found (Table 2). However, this organic acid decreased slowly and only by half after transfer to nitrate or glutamate (Fig. 3B), in which GSII reached very high levels (Table 2). As expected, glutamine varied in the opposite way, since it increased severalfold during the first hours in ammonium or glutamine

TABLE 2. *R. phaseoli* GOGAT, GSI, and GSII activities as a function of the nitrogen source

Enzyme	Assay	Sp act (U/mg of protein) ^a			
		NH ₄ Cl	KNO ₃	Glutamate	Glutamine
GSI	Transferase	414	380	432	396
	Synthetase	4	2	5	2
GSII	Transferase	156	860	910	396
	Synthetase	15	83	81	22
GOGAT		32	30	8	32

^a Cells were grown on MM supplemented with different nitrogen sources. Enzymatic determinations were made at 12 h of growth. The data represent the means of at least five different determinations, with a standard deviation of <5%.

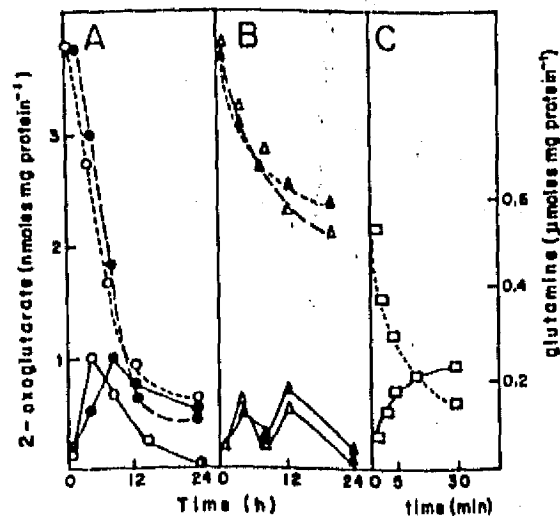


FIG. 3. Levels of 2-oxoglutarate and glutamine during growth on MM supplemented with different nitrogen sources and after ammonium addition to glutamate-grown cultures of *R. phaseoli*. Cells were grown on MM with different nitrogen sources, and samples were withdrawn at the indicated times to determine 2-oxoglutarate (---) and glutamine (—) as described in Materials and Methods. Panels: A, cells grown with glutamine (●) or NH₄Cl (○) as the nitrogen source; B, cells grown with nitrate (▲) or glutamate (△) as the nitrogen source; C, ammonium-shocked cells (□) (the cells were grown for 10 h in glutamate, and at time zero 5 mM NH₄Cl was added).

cultures (Fig. 3A) and rose slightly in nitrate and glutamate (Fig. 3B). On the other hand, GSI decreased from PY to MM (glutamate) (Fig. 1B); this coincided with a reduction in 2-oxoglutarate (Fig. 3B).

It has been reported that GSII activity decreases after addition of ammonium in several *Rhizobium* sp. strains (4, 6, 11, 16). We tested the effect of ammonium addition to a culture during the exponential phase of growth with glutamate as the nitrogen source, in which GSII activity is very high. Transferase and synthetase GSII activities decrease 50% 2 h after ammonium addition and became undetectable 4 h later (Fig. 4A). Since the doubling time in this condition is close to 3 h, GSII activity was lost at a rate greater than expected from dilution of the previously accumulated enzyme. Also, the loss of GSII activity after ammonium shock corresponded to the residual amount of GS found after sedimentation on sucrose gradients (Fig. 2B). This effect of ammonium shock was not relieved by shifting the culture to glutamate (Fig. 4B). When glutamine was added to the glutamate-grown cultures, GSII activity was also decreased; however, full activity was regained when the cultures were shifted again to glutamate (Fig. 4C). As expected, ammonium addition caused a rapid increase in the level of glutamine and a corresponding decrease in 2-oxoglutarate content (Fig. 3C).

After ammonium shock, GSI biosynthetic activity became undetectable (data not shown) and the GSII presented physical and catalytic properties different from those of GSII before ammonium shock. The apparent K_m for glutamate increased from 4 to 100 mM, and the enzyme became more thermolabile at 50°C, since its half-life decreased from 7 to 3 min.

Cells grown on MM with an amino acid as the nitrogen source, upon reaching the prestationary phase, excrete

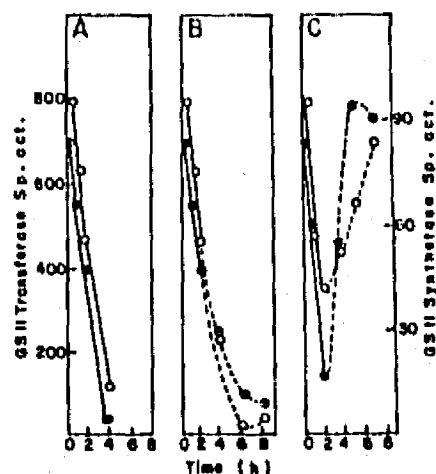


FIG. 4. Inactivation of GSII activity in *R. phaseoli* after ammonium or glutamine addition and recovery of this activity after transfer of cells to derepression medium. Cells were grown for 10 h on MM with glutamate as the nitrogen source. At time zero, the culture was divided, and one half was ammonium shocked and the other was glutamine shocked. Samples were harvested for the following 2 h, and GSII activity (—) was determined. At 2 h after ammonium or glutamine addition, both cultures were transferred to derepression medium (glutamate), and samples were withdrawn for the following 6 h to determine GSII activity (---). GSII activity was determined by synthetase (○) and transferase (●) assay. Panels: A, ammonium-shocked culture; B, ammonium-shocked culture transferred to glutamate medium; C, glutamine-shocked culture transferred to glutamate medium.

ammonium into the medium (Table 3). This must be the result of amino acid catabolism and the inability of cells to reassimilate ammonium because of loss of GS activities (Fig. 1B and C). Ammonium excretion was higher on glutamine, histidine, or arginine than on glutamate or proline (Table 3). Ammonium was also excreted on glutamate with longer incubation times (data not shown).

GOGAT activity increased during exponential growth on MM with NH_4Cl , KNO_3 , or glutamine as a nitrogen source and remained high and constant during 24 h of growth. In contrast, when the culture was grown with glutamate as the nitrogen source, GOGAT activity decreased (Table 2).

We also found that this activity was fourfold higher with succinate than with glucose or fructose as the carbon source (Table 4). Some metabolites derived from glucose or fructose catabolism must inhibit GOGAT activity, since almost a fourfold increase was observed after dialysis of cell extracts from glucose or fructose cultures; however, only a minor increase (1.2-fold) was found after dialysis of extracts from succinate-grown cells (Table 4). The inhibitory effect of the

TABLE 3. Ammonium excretion by *R. phaseoli* cultured with different nitrogen sources^a

Nitrogen source	Ammonium concn (mM)
Glutamate	0.01
Proline	0.08
Glutamine	7.42
Histidine	6.33
Arginine	7.01

^a Cells were grown on MM with the indicated nitrogen source. At 36 h of growth, the ammonium concentration in the medium was determined.

TABLE 4. *R. phaseoli* GOGAT activity as a function of the carbon source and in vitro inhibition by some oxoacids

Culture condition ^a	GOGAT sp act ^b (U/mg of protein)			
	Not desalted	Desalted	Citrate (25 mM) ^c	Glyoxylate (25 mM) ^c
Succinate	33	39	15	17
Fructose	7	28	9	ND ^d
Glucose	9	31	14.5	ND

^a Cells were grown on MM supplemented with different carbon sources and NH_4Cl as the nitrogen source. Enzymatic determinations were made after 12 h of growth.

^b The data represent the means of at least three different experiments.

^c Oxoacids were added to desalted cell extracts from cultures grown on the carbon sources shown.

^d ND, Not determined.

carbon source could probably be exerted by 2-oxoacids such as glyoxylate and citrate, since these compounds inhibited 50% of the in vitro GOGAT activity when present at 25 mM (Table 4).

DISCUSSION

We identified the GS-GOGAT (NADPH) pathway operating in *R. phaseoli* growing on PY or MM with one carbon and one nitrogen source.

We found that the GSI and GSII enzymes are regulated in a reciprocal manner. In complex medium, GSI was the only GS present; however, on MM supplemented with succinate and NH_4Cl or other nitrogen sources, GSI activity was lost and GSII was induced. The presence of specific GS with high or low activity was selected in accordance with the different requirements to synthesize glutamine on MM or PY (Table 1).

The nitrogen source regulated GSII activity; GSII was repressed with ammonium and glutamine and derepressed with glutamate and nitrate as nitrogen sources (Table 2). GSI activity was deadenylylated on PY (Fig. 1A) and during ammonium limitation (data not shown), under both of which conditions the 2-oxoglutarate/glutamine ratio was rather high. A decrease in the ratio coincided with an increase in adenylylation, low GSI biosynthetic activity, and appearance of GSII activity. However, only a slow decrease in the 2-oxoglutarate/glutamine ratio led to high GSII activity, since when the ratio decreased rapidly low GSII activity was found (Fig. 3A and B; Table 2). This relation was also observed after addition of ammonium to glutamate-grown cultures, in which a change in the physical and catalytic properties of GSII coincided with loss of its biosynthetic and transferase activities (Fig. 4A) and a rapid decrease in the 2-oxoglutarate/glutamine ratio (Fig. 3C). However, a difference exists between the effects of ammonium and glutamine on GSII inactivation. GSII activity was lost after glutamine addition and could be regained when the culture was shifted to glutamate (Fig. 4C); this did not happen after ammonium addition (Fig. 4B).

These data indicate that GSI is regulated on the basis of the kinetics and amount of carbon skeletons such as 2-oxoglutarate and nitrogen metabolites such as glutamine. This regulation is similar to that found in *Escherichia coli* (28). When the growth rate decreased, GSII activity fell to very low levels independently of the 2-oxoglutarate/glutamine ratio. We do not know what caused this inactivation.

The lack of GSII activity in *R. phaseoli* when the culture reached the prestationary phase of growth resulted in am-

monium excretion (Table 3). A similar result was obtained when ammonium-shocked cultures were transferred to MM with an amino acid (data not shown). This metabolic pattern resembles some metabolic characteristics of rhizobium when in symbiosis with plants. A previous report of Evans and Crist (9) indicates that ammonium excretion by *Rhizobium* sp. 32H1, a slow-growing bacterium, in free-living N₂-fixing conditions starts when GSI is highly adenylylated and coincides with the decrease of GSII activity.

Reflecting the different ammonium assimilatory requirements, GOGAT activity was higher in MM than in PY. GOGAT regulation was achieved by glutamate repression (Table 2) and enzyme inhibition by organic acids (Table 4), as reported for other microorganisms (17, 18).

As previously reported, the *R. meliloti* GSI gene hybridized with the *E. coli* GS gene (25). Similar observations were found for *R. phaseoli* GSI. Furthermore, a GSII DNA probe of *B. japonicum* (4) hybridized in Southern blot analysis with total *R. phaseoli* DNA, giving two bands when cut with *EcoRI* (unpublished data). Finally, specific DNA probes for GDH (NADPH) (23) and GOGAT (NADPH) (14) from *E. coli* did not hybridize with total DNA from *R. phaseoli* (unpublished data). Some homology between the GOGAT genes from *R. phaseoli* and *E. coli* may be expected, since the enzymes have similar activities and the same cofactor. However, no DNA homology for GDH was expected to be found in *R. phaseoli*, since no GDH activity was detected.

There is evidence indicating that the presence of active GDH is incompatible with N₂ fixation by *R. meliloti* during symbiosis (21). We found that, when the *E. coli* *gdhA* gene was introduced into *R. phaseoli*, plants were preferentially nodulated by cells which lost the plasmid that harbors the *gdhA* gene. This suggests that effective nodulation is impaired if ammonium is assimilated by GDH (3a).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rafael Palacios and Yolanda Mora for critical review of the manuscript.

This research was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

LITERATURE CITED

- Bender, R. A., K. S. Janssen, A. D. Resnick, M. Blumenberg, F. Foor, and B. Magasanik. 1977. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 129:1001-1009.
- Bertogger, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.
- Rhondari, B., and D. J. D. Nicholas. 1986. Properties of glutamine synthetase of bacteroids from root nodules of *Glycine max*. *Plant Sci.* 44:89-96.
- Bravo, A., B. Becerril, and J. Mora. 1988. Introduction of the *Escherichia coli* *gdhA* gene into *Rhizobium phaseoli*: effect on nitrogen fixation. 170:985-988.
- Carlson, T. A., and B. K. Chelm. 1986. Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Nature (London)* 322:568-570.
- Carlson, T. A., M. L. Guerinot, and B. K. Chelm. 1985. Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (*glnA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 162:698-703.
- Darrow, R. 1980. Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation, p. 139-166. In J. Mora and R. Palacios (ed.), *Glutamine synthetase: metabolism, enzymology and regulation*. Academic Press, Inc., New York.
- Darrow, R., and R. Knotts. 1977. Two forms of glutamine synthetase in free living root nodule bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78:554-559.
- Esplin, G., R. Palacios, and J. Mora. 1970. Glutamine metabolism in nitrogen starved conidia of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 115:59-68.
- Evans, W., and D. Crist. 1984. The relationship between the state of adenylylation of glutamine synthetase I and the export of ammonium in free living N₂ fixing *Rhizobium*. *Arch. Microbiol.* 138:26-30.
- Fuchs, R. L., and D. L. Kelster. 1980. Comparative properties of glutamine synthetases I and II in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 144:641-648.
- Hawitt, S., and P. Gresshoff. 1985. Ammonia regulation of glutamine synthetase in *Rhizobium* sp. ANU289. *J. Gen. Microbiol.* 131:1733-1740.
- Hummelt, G., and J. Mora. 1980. NADH-dependent glutamate synthase and nitrogen metabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:127-133.
- Kondorosi, A., Z. Svab, G. B. Kiss, and R. Dixon. 1977. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 151:221-226.
- Lozoya, E., R. Sanchez-Pescador, A. Covarrubias, I. Vichido, and F. Hollivar. 1980. Tight linkage of genes that encode the two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 144:616-621.
- Ludwig, R. A. 1978. Control of ammonium assimilation in *Rhizobium* 32H1. *J. Bacteriol.* 135:114-123.
- Ludwig, R. A. 1980. Physiological roles of glutamine synthetases I and II in ammonium assimilation in *Rhizobium* sp. 32H1. *J. Bacteriol.* 141:1209-1216.
- Miller, R. E., and E. R. Stadtman. 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli*: an iron-sulfide flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 247:7407-7419.
- Mora, Y., G. Hernandez, and J. Mora. 1987. Regulation of carbon and nitrogen flow by glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 133:1667-1674.
- O'Gara, F., S. Manian, and J. Meade. 1984. Isolation of an Asn⁻ mutant of *Rhizobium japonicum* defective in symbiotic N fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* 24:241-245.
- O'Gara, F., and K. Shanmugam. 1976. Control of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobia*. Regulation of NH₄⁺ assimilation. *Biochem. Biophys. Acta* 451:342-352.
- Osborne, M. S., and E. R. Signer. 1980. Ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 143:1234-1240.
- Quinto, C., H. De la Vega, M. Flores, L. Fernandez, L. Ballado, G. Soheron, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* 299:724-726.
- Sanchez-Pescador, R., E. Sanvicente, F. Valle, and F. Hollivar. 1982. Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from *Escherichia coli* K12. *Gene* 17:1-8.
- Shapiro, B. M., and E. R. Stadtman. 1970. Glutamine synthetase (*E. coli*). *Methods Enzymol.* XVIII(A):910-922.
- Somerville, J. E., and M. L. Kahn. 1983. Cloning of the glutamine synthetase I gene from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 156:168-176.
- Tempest, D. W., J. L. Meers, and C. M. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117:405-407.
- Valtruhel, F., B. Bhanderg, and D. J. Nicholas. 1985. Glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in *Rhizobium japonicum* strains grown in cultures and in bacteroids from root nodules of *Glycine max*. *Planta* 159:296-315.
- Wohlveiter, R. M., H. Schmitz, and H. Holzer. 1973. Regulation of glutamine synthesis *in vivo* in *E. coli*, p. 9-64. In S. Prusiner and E. R. Stadtman (ed.), *The enzymes of glutamine metabolism*. Academic Press, Inc., New York.

NOTES

Introduction of the *Escherichia coli* *gdhA* Gene into *Rhizobium phaseoli*: Effect on Nitrogen Fixation

ALEJANDRA BRAVO,¹ BALTAZAR BECERRIL,² AND JAIME MORA^{1*}

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A,¹ and Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,² Cuernavaca, Morelos, México

Received 13 July 1987/Accepted 17 November 1987

Rhizobium phaseoli lacks glutamate dehydrogenase (GDH) and assimilates ammonium by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. A strain of *R. phaseoli* harboring the *Escherichia coli* GDH structural gene (*gdhA*) was constructed. GDH activity was expressed in *R. phaseoli* in the free-living state and in symbiosis. Nodules with bacteroids that expressed GDH activity had severe impairment of nitrogen fixation. Also, *R. phaseoli* cells that lost GDH activity and assimilated ammonium by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway preferentially nodulated *Phaseolus vulgaris*.

Bacteria of the genus *Rhizobium* have a symbiotic interaction with leguminous plants. They are able to fix nitrogen in root nodules, in which the bacteria differentiate into bacteroids (27). Nodule formation and bacterial differentiation are multistep processes which require complex interactions of the symbiont with its host plant. At present, little is known about the biochemical events that allow *Rhizobium* spp. to engage in effective symbiosis.

The *Rhizobium* enzymes involved in ammonium assimilation are switched off during symbiotic nitrogen fixation, allowing fixed nitrogen to be excreted and assimilated by the plant (6, 12, 25). However, free-living bacteria are able to assimilate ammonium. It has been reported that in several *Rhizobium* species, ammonium assimilation proceeds mainly through the glutamine synthetase (GS)-glutamate synthase (GOGAT) pathway. All glutamate auxotrophs that have been isolated from *Rhizobium* spp. are affected in their GOGAT activity (8, 11, 15, 21, 22), and no mutants have been found with altered glutamate dehydrogenase (GDH) activity. We found that in *Rhizobium phaseoli*, ammonium is assimilated by the GS-GOGAT pathway, since no GDH activity was detected (5), and the *Escherichia coli* GDH structural gene did not hybridize with total DNA from *R. phaseoli* (unpublished data).

It may be questioned why *Rhizobium* species do not assimilate ammonium through the GDH-GS pathway. Is the GS-GOGAT pathway in *Rhizobium* species a necessary condition for establishment of effective symbiosis with a plant? To answer these questions, we introduced the *E. coli* *gdhA* gene into an *R. phaseoli* wild-type strain and studied its expression and its effects in culture and during symbiosis.

The *E. coli* *gdhA* structural gene contained in plasmid pSAE4 (26) was subcloned into the plasmid vector pRK404 (7) (Fig. 1). Plasmid pSAE4 was cleaved with *Hind*III, *Pst*I, and *Pvu*II, and the fragments were separated by agarose gel electrophoresis. The band corresponding to the 3.6-kilobase *Hind*III-*Pst*I fragment was purified by electroelution and ligated (16) into the pRK404 plasmid previously digested

with *Hind*III-*Pst*I. After transformation (16) into *E. coli* PA340, which lacks GDH and GOGAT activities (2), clones harboring a recombinant plasmid were selected by tetracycline (10 µg/ml) resistance in complex LB medium (18) and by growth on minimal M9 medium (3) containing 10 mM NH₄Cl as the nitrogen source. This construction, pAB17, was mobilized from *E. coli* to *R. phaseoli* CFN42 (23) in a triparental mating, with *E. coli* HB101(pRK2013) (4) as the donor or helper plasmid (10). The *Rhizobium* transconjugants were selected on complex PY medium (19) supplemented with tetracycline and nalidixic acid (100 µg/ml). Strain CFN4250 harbors plasmid pAB17, which contains the GDH gene, and strain CFN4251, harboring the pRK404 plasmid, was used as the control strain.

Further analysis of strain CFN4250 revealed that it harbored a 14-kilobase plasmid containing a 3.6-kilobase insert which corresponded to the fragment isolated from plasmid pSAE4 (data not shown).

To determine the stability of plasmids pAB17 and pRK404 in *R. phaseoli*, the respective strains were grown in nonselective (PY) medium during three growth cycles of 36 h each, and every 4 h the cells were plated onto agar plates of PY medium with or without tetracycline. There were 10 cell doublings per growth cycle, and the plasmid loss was 1% per cell doubling for both plasmids. The percentage of plasmid loss was determined from the difference between cells grown on PY and those grown on PY plus tetracycline.

To ensure that we had cloned the *gdhA* structural gene, we determined the GDH activity of strains CFN4250 and CFN4251(pRK404). The cells were harvested by centrifugation at 4°C, suspended in the extraction solutions, and ruptured with Braun cell homogenizer MSK type 853030 and 0.1-mm (diameter) glass beads. GDH activity was extracted with 50 mM Tris hydrochloride-10 mM mercaptoethanol (pH 7.6). GDH and GOGAT activities were detected by monitoring NADPH oxidation at 340 nm. GOGAT activity was extracted and determined as described elsewhere (5), and GDH activity was measured in a 1-ml reaction mixture containing 50 mM Tris (pH 7.6), 5 mM 2-oxoglutarate, 0.25 mM NADPH, 40 mM NH₄Cl, and 0.05 ml of cell extract.

* Corresponding author.

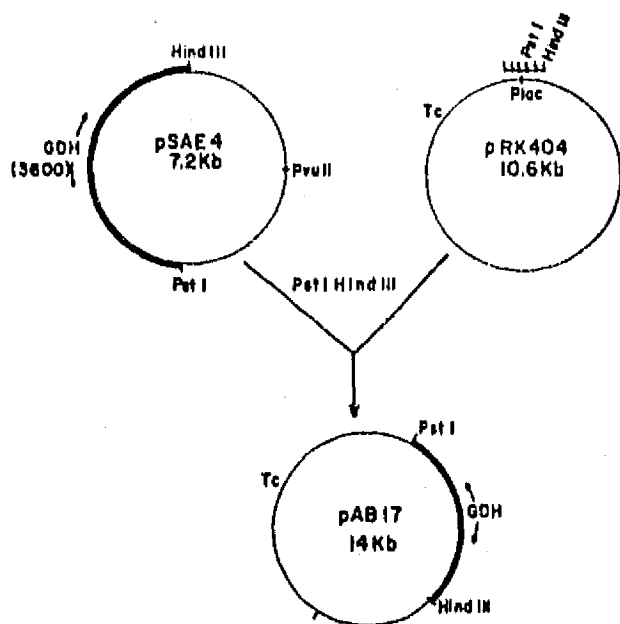


FIG. 1. Diagrammatic representation of the construction of the pAB17 derivative. Tc, Tetracycline.

GDH activity was also measured by determining the glutamate formed, as described elsewhere (5).

Only strain CFN4250 was able to express GDH activity, and at the same level as in *E. coli* PA340(pAB17), (Table 1). The *E. coli* GDH activity in *R. phaseoli* CFN4250 was expressed in a constitutive manner in media containing different nitrogen sources (data not shown), in contrast to the repression by glutamate observed in *E. coli* (14).

The presence of GDH activity in *R. phaseoli* affected the intracellular concentrations of its substrate and product. The 2-oxoglutarate content was lower and the glutamate content was higher in the strain with GDH activity (Table 1), even though GOGAT activity was lower than in the strain lacking GDH activity.

Further evidence for the operations of the GDH-GS pathway in strain CFN4250 was its capacity to grow on minimal medium containing NH_4Cl as the sole nitrogen source and L-methionine sulfone (MSF; Fig. 2A), an inhibitor of GOGAT activity (Fig. 2B; 17).

The results presented indicate that the *E. coli* GDH activity expressed in *R. phaseoli* is able to produce the glutamate needed to support growth when GOGAT is inactivated by MSF. This was also reflected by an increase in glutamate (Table 1), which possibly leads to GOGAT repres-

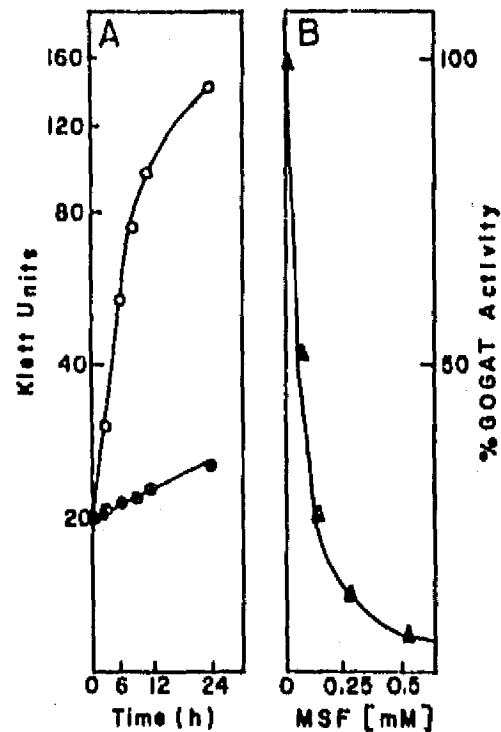


FIG. 2. Growth of *R. phaseoli* strains in the presence of MSF and in vitro inhibition of GOGAT activity by this metabolite. (A) Cells were grown on minimal medium with 10 mM NH_4Cl as the nitrogen source in the presence of 5 mM MSF. Symbols: \circ , CFN4250; \bullet , CFN4251. (B) In vitro inhibition of GOGAT activity from *R. phaseoli* CFN42 by MSF.

sion (5; Table 1) and a consequent decrease in 2-oxoglutarate.

To determine the symbiotic properties of strain CFN4250, *Phaseolus vulgaris* was inoculated with this strain and CFN4251. The seeds were surface sterilized in 20% hypochlorite and germinated on moist, sterile filter paper (19). Three-day-old seedlings were transferred to plastic growth pots, inoculated with a bacterial suspension in PY medium, and grown on nitrogen-free salts solution in a greenhouse (24). Three weeks after inoculation, all plants infected by these strains were nodulated normally. We removed the nodules from the plants to look for the presence of the plasmid in the isolated bacteria. Recovery of bacteria from nodules was done as previously described (20). Plants were preferentially nodulated by rhizobia that had lost the plasmid that harbors the *E. coli gdhA* gene. Only 21% of the nodules formed by strain CFN4250 (GDH^+) were Tc^r . This is in

TABLE 1. Relationships among the presence of GDH and GOGAT activities, 2-oxoglutarate, and glutamate content in *R. phaseoli* strains^a

Strain	Sp act ($\mu\text{mol}/\text{min}$ per mg of protein) of:				Concn (nmol/mg of protein) of:	
	GDH		GOGAT		2-Oxoglutarate	Glutamate
	NADPH oxidized	Glutamate produced	NADPH oxidized	ND		
CFN4250	0.265	0.250	0.020	ND	1.5	200
CFN4251	0.004	0.002	0.045	ND	2.7	101
PA340(pAB17)	0.331	ND	ND	ND	ND	ND

^a Cells were grown for 12 h on minimal medium supplemented with 10 mM NH_4Cl as the nitrogen source. ND, Not determined.

TABLE 2. Acetylene reduction and GDH and GOGAT activities in nodules and bacteroids from plants inoculated with a strain harboring the *E. coli gdhA* gene

Strain (phenotype)	Mean \pm SEM % Te ⁺ nodules ^a	Mean \pm SEM % nitrogenase activity ^b	Sp act (μ mol of NADPH/min per mg of protein)	
			GDH	GOGAT
CFN4250 (GDH ⁺)	21 \pm 8	15 \pm 3	0.320	0.012
CFN4251 (GDH ⁻)	75 \pm 10	100 \pm 15	0.001	0.020

^a Five seeds were inoculated for each experiment, and the data are from five different experiments. All of the nodules present in each plant were crushed to test the bacterial phenotype.

^b Nitrogenase specific activity was determined in detached nodules, and the bacterial antibiotic markers were determined afterward. The data are from 20 Te⁺ nodules used in two different experiments.

contrast to the plants inoculated with strain CFN4251, in which 75% of the nodules were Te⁺ (Table 2).

Nitrogenase activity was determined by measurement of acetylene reduction in detached nodules. The nodules were transferred to tubes with rubber seal stoppers, acetylene was injected to a final concentration of 10% of the gas phase, and ethylene production was determined by gas chromatography with a Packard model 430 chromatograph. The activity found in detached Te⁺ nodules was only 15% of that found in nodules from plants inoculated with CFN4251 (GDH⁻) or CFN4250, which had lost the plasmid (Te⁻) (Table 2).

Finally, to verify that the nodules formed by strain CFN4250 really expressed GDH activity, bacteroids were isolated as described by Awonaike et al. (1) and GDH activity was determined. Bacteroids from Te⁺ nodules with GDH⁺ strains expressed activity at the same level as the free-living bacteria harboring the *E. coli gdhA* gene (Table 2). However, bacteroids from nodules with GDH⁻ strains, originating from infection with Te⁺ strains CFN4250 and CFN4251, had an almost undetectable amount of GDH (Table 2). The GOGAT activity of the isolated bacteroids was lower in those that harbored the *E. coli gdhA* gene (Table 2).

We found that 90% of the bacteria isolated from Te⁺ nodules are Te⁺. A correlation can be established among the Te⁺ bacteria found in nodules inoculated with strain CFN4250, the presence of GDH activity, and the 85% decrease in the nitrogenase activity of these nodules. On the other hand, nodules with Te⁻ bacteria lacked GDH activity and had optimal nitrogenase activity.

The presence of GOGAT activity in bacteroids does not interfere in the formation of an effective symbiosis between *Rhizobium* spp. and plants. However symbiotic nitrogen fixation seems to be affected by the presence of GDH activity in *R. phaseoli*; detached nodules infected by strain CFN4250 had a sixfold diminution in acetylene reduction (Table 2). These data agree with the previous report of Osborne and Signer (22) that GOGAT⁻ phenotype revertants isolated from plant nodules which expressed high levels of GDH activity are able to nodulate clover but do not fix nitrogen. Recently, Lane et al. have reported the introduction of the *E. coli gdhA* gene in *R. japonicum* (13). The recipient strain used was an *Asm*⁻ mutant strain of *R. japonicum* which was unable to grow with NH₄Cl as the nitrogen source, lacked GOGAT activity, and did not express nitrogenase in the nodules. In this genetic background, they found no effect of GDH activity on symbiotic properties.

Nodules formed by bacteria with GDH activity have a severe reduction in nitrogen fixation. An active GDH enzyme in bacteroids could probably interfere with N₂ fixation by draining carbon skeletons and reductive power or by

formation of its product, glutamate. There is evidence that 2-oxoglutarate is needed to support nitrogen fixation, since a mutant lacking 2-oxoglutarate dehydrogenase is impaired in nitrogen fixation (9).

As presented in this paper, *R. phaseoli* bacteroids were not able to switch off *E. coli* GDH activity (Table 2). Plants were preferentially nodulated by strains that had lost the plasmid harboring the *gdhA* gene (Table 2). It seems that plants are preferentially nodulated with rhizobia capable of ammonium assimilation by the GS-GOGAT pathway, which leads to effective symbiosis. We are cloning the *gdhA* gene in a stable plasmid to determine whether plants can preferentially select rhizobia with a specific ammonium assimilation pathway.

We thank M. S. Lourdes Blanco and Alejandra Covarrubias for critical review of the manuscript, F. Bolivar for helpful discussions, and Y. Mora for help in preparing the manuscript.

This research was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, Mexico, and the R. J. Zevada Foundation.

LITERATURE CITED

- Awonaike, K. O., P. J. Lea, and B. J. Millin. 1981. The location of the enzymes of ammonia assimilation in root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Sci. Lett.* 23:189-195.
- Derberich, M. A. 1972. A glutamate dependent phenotype in *E. coli* K-12: the result of two mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:1498-1503.
- Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.
- Boyer, H. B., and D. Roulland-Dussolx. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
- Brava, A., and J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170:980-984.
- Brown, C. M., and M. J. Dilworth. 1975. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 86:39-48.
- Ditta, G., T. Schmidhauser, E. P. Yakobson, X. W. Kiang, D. R. Finlay, D. Gulney, and D. R. Hellenski. 1985. Plasmids related to the broad host range vector pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13:149-153.
- Donald, R. G. K., and R. A. Ludwig. 1984. *Rhizobium* sp. strain ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 158:1144-1151.
- Duncan, M. J., and D. G. Fraenkel. 1979. α -Ketoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 137:415-419.
- Guerry, P., J. Van Embden, and S. Falkow. 1974. Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes. *J. Bacteriol.* 117:619-630.
- Kondoroski, A., Z. Svab, G. B. Kliss, and R. Dixon. 1977. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meli-*

- loti*. Mol. Gen. Genet. 151:221-226.
12. Kurz, W. G. W., D. A. Rokush, and T. A. LaRue. 1975. Enzymes of ammonia assimilation in *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. J. Microbiol. 21:1009-1012.
 13. Lane, M., J. Meade, S. S. Manlan, and F. O'Gara. 1986. Expression and regulation of the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene (*gdh*) in *Rhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 144:29-34.
 14. Llang, A., and R. L. Houghton. 1981. Coregulation of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) transhydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in enteric bacteria during nitrogen limitation. J. Bacteriol. 146:997-1002.
 15. Ludwig, R. A. 1978. Control of ammonium assimilation in *Rhizobium* 32111. J. Bacteriol. 135:114-123.
 16. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual, p. 164-165, 250-251. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 17. Master, D., and A. Melster. 1982. Inhibition by homocysteine sulfonamide of glutamate synthase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 257:8711-8715.
 18. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics, p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 19. Noel, K. D., A. Sanchez, L. Fernandez, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158:148-155.
 20. Noel, K. D., K. A. Vandenbosch, and B. Kulpaca. 1986. Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. J. Bacteriol. 168:1392-1401.
 21. O'Gara, F., S. Manlan, and J. Meade. 1984. Isolation of an *Asm⁻* mutant of *Rhizobium japonicum* defective in symbiotic N₂ fixation. FEMS Microbiol. Lett. 24:241-245.
 22. Osborne, M. S., and E. R. Signer. 1980. Ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 143:1234-1240.
 23. Quinto, C., H. De la Vega, M. Flores, L. Fernandez, L. Bullado, G. Soberon, and R. Palacios. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature (London) 299:724-726.
 24. Quinto, C., H. De la Vega, M. Flores, J. Lemans, M. A. Cevallos, M. A. Pardo, R. Aspíroz, M. A. Gilard, E. Calva, and R. Palacios. 1985. Nitrogenase reductase: a functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1170-1174.
 25. Robertson, J. G., M. P. Warburton, and K. J. Fardnen. 1975. Induction of glutamate synthase during nodule development in lupin. FEBS Lett. 55:22-37.
 26. Sanchez-Pescador, R., E. Sanvicente, F. Valle, and F. Bollivar. 1982. Recombinant plasmids carrying the glutamate dehydrogenase structural gene from *Escherichia coli* K-12. Gene 17:1-8.
 27. Verma, D. P. S., and S. Long. 1983. The molecular biology of *Rhizobium* legume symbiosis. Int. Rev. Cytol. 14(Suppl.):211-245.

Isolation and characterization of a Tn5 induced mutant of Rhizobium phaseoli affected in the GSII activity and nitrogen fixation.

A. Bravo, L. M. Martínez, J. Calderón, and J. Mora

INTRODUCTION

Rhizobium phaseoli assimilates ammonium by the coordinated activities of glutamine synthetase (GS)-glutamate synthase (GOGAT) (Bravo 1988). As all other Rhizobia reported it has two GS isoforms (Bravo 1988) GSI and GSII.

The Rhizobiaceae GSI is structurally similar to the GS of enteric bacteria (Darrow 1980, Carlson 1985). In Bradyrhizobium japonicum the glnA gene is constitutively transcribed from a single promoter, under several growth conditions (Carlson 1985). This promoter has a structure of the enterobacterial consensus promoters (Carlson 1987). This enzyme is only regulated by modification of the catalytic activity by adenylation (Bravo 1988). On the other hand, the nucleotide sequence of the GSII gene from Bradyrhizobium japonicum showed 47% of homology with the GS gene from plants (Carlson 1986). In this bacteria the glnII gene transcription is regulated in response to nitrogen source availability (Carlson 1987). It has been shown that glnII gene is also transcribed from a single promoter which has a structural characteristics of promoters controlled by the Ntr system (Carlson 1987). The glnII gene promoter is significant homologous to the nifH, nifDK promoters in the -8 to -26 region, which is thought to be recognized by RNA polymerase containing the sigma factor coded by ntrA (Ow 1983). Moreover the glnII gene has a sequence at -103 to -119, which matches with the consensus sequence of NR_I binding site (Carlson 1987).

In R. phaseoli it has been shown that the biosynthetic activity of GSI and GSII are regulated in response to changes in the ratio 2-oxoglutarate/glutamine (Bravo 1988). The GSI activity was adenylylated on complex medium (PY), in this condition the 2-oxoglutarate/glutamine ratio was rather high. When the culture is transferred to minimal medium with one carbon and one nitrogen source, the ratio decreased. A decrease in the ratio 2-oxoglutarate/glutamine, coincided with an increase in adenylation of GSI enzyme and with the induction of GSII activity. However the GSII induction varied depending on the rate of change of this ratio (Bravo 1988). The GSII activity disappears when the 2-oxoglutarate/glutamine ratio decrease further, like in ammonium shocked cultures (Bravo 1988). Similar findings has been reported for the transcription regulation of glnII gene in B. japonicum, during growth in minimal medium (Carlson 1987).

The reason of the presence of two GS enzymes is still puzzling in Rhizobia. Also, it is unknown if there is a functional relation between GSI or GSII expression and different environmental conditions. A further relevant question is if the function of both GSs is related with the symbiotic process of Rhizobium with leguminous plants. Recently it has been reported that R. meliloti strains lacking each one or both GSs enzymes does not affect nodulation and N₂ fixation (Rossbach 1988), however the glnA⁻ glnII⁻ double mutants of B. japonicum, are unable to nodulate

soybeans (Carlson 1987).

In this paper, we present the isolation and characterization of a R. phaseoli Tn5 mutant which is affected in GSII activity, carbon utilization in minimal medium and has a fix delayed phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions.

The parent strain employed was *R. phaseoli* wild type CFN42 (Rif resistant) (Quinto 1982). The *R. phaseoli* CE3 strain is a derivative Sm resistant of CFN42 (Noel 1984). *R. phaseoli* AB2 strain is a mutant strain isolated in this study.

The parent and mutant strains were kept at 4°C on PY medium (Bravo 1988) and were transferred at monthly intervals. The cells were grown aerobically at 30°C on minimal medium MM (Beringer 1974) as previously described (Bravo 1988). Antibiotics used were: Kanamycin (Km), 30 g/ml; rifampicin (Rif), 25 g/ml; streptomycin (Sm), 100 g/ml.

Tn5 mutagenesis.

The mobilizable "suicide plasmid" pSUP5011 carrying Tn5 mob (Simon 1983) was mobilized into *R. phaseoli* CFN42 wild type strain. Matings were done on PY plates overnight at 30°C, the cells were then suspended in sterile water and plated on selective medium (PY Rif Km).

Isolation of mutants.

Mutagenized cells were replicated on MM plates supplemented with 10 mM succinate, 10mM NH₄Cl plus 10mM KNO₃ as carbon and nitrogen sources respectively and on succinate plus 10 mM glutamate. After 4 days of growth at 30°C colonies unable to grow on NH₄Cl and KNO₃ were purified on PY Km plates, utilizing 0.01% Tween in order to have isolated colonies. Colonies were purified until a stable phenotype could be stabilized.

Determination of GS activity.

GSI and GSII activities were assayed with whole cells prepared as described (Bravo 1988). GS was measured by its transferase and synthetase activities as described by Bender. (Bender 1977). Specific activities were expressed as units per milligram of protein; 1 U represents 1 nmol of gamma-glutamyl hydroxamate produced per min. The two GS enzymes were distinguished by their different heat stabilities and their different sedimentation on sucrose density gradients as described (Bravo 1988).

Metabolite determination.

Samples for glutamine and ammonium determination were collected and metabolite determined as previously described (Bravo 1988). Glutamine consumption was measured after 24 h of growth on MM supplemented with succinate and glutamine. The ammonium excretion was determined after 12 h of growth on the same medium.

The radioactive CO_2 released from glutamine oxidation was quantified as described (). Cultures were labeled for 1.5 h with ($\text{U-}^{14}\text{C}$) glutamine at Ci/ml on 10 ml of media supplemented with 10 mM succinate and glutamine as carbon and nitrogen sources.

Nitrogen fixation determination.

For nodulation and acetylene reduction measurements.

Phaseolus vulgaris cv negro jamapa were surface sterilized in hypochlorite and germinated on moist sterile filter paper. Three day old seedlings were transferred to plastic growth pods, inoculated with a bacterial suspension in PY medium and grown with nitrogen free salts (Quinto 1985) in a green house. Nodulation was scored and nitrogenase was determined by measuring the acetylene reduction of nodulated plants roots transferred to tubes with rubber seal stoppers, by injecting acetylene to a final concentration of 10% of the gas phase. Ethylene production was determined by gas chromatography in a Packard model 430 chromatograph.

RESULTS

Isolation and characterization of AB2 mutant.

A mutant strain of *R. phaseoli* unable to grow on NH_4Cl and KNO_3 as nitrogen source, was isolated following Tn5 mutagenesis. About 6,000 Km resistant mutant colonies were screened. The strain AB2 was selected as being incapable of growing prototrophically. Further characterization showed that batch cultures of the mutant have 12 h lag period and 6 h doubling time when grown on M.M. supplemented with succinate and KNO_3 or NH_4Cl as sole nitrogen sources (Fig.1). The same results were observed when AB2 strain was grown on glucose and KNO_3 (data not shown) and a 5h doubling time were observed when grown on M.M. supplemented with glucose and NH_4Cl (data not shown).

Strain AB2 has a single Tn5 insertion as proven by Southern blot hybridization of total DNA against Tn5 sequence (Fig 2A). The Tn5 insertion was shown to be genetically linked to the pleiotrophic phenotype of AB2 strain. Plasmid PJB3 was introduced into strain AB2, this plasmid contains the functions necessary to mobilize the mob sequences present in the Tn5 (Brewin 1980, Simon 1983). Strain AB2/PJB3 was mated with a streptomycin resistant derivative of CFN42. Kanamicine resistance was mobilized at a frequency of 10^{-4} . Transconjugants were found to be GSII deficient, unable to use nitrate and succinate and had a Fix delayed phenotype, indicating that this complex phenotype was due to a single Tn5 insertion.

Glutamine metabolism in AB2 mutant.

The AB2 mutant excretes ammonium to the medium when it was grown on glutamate as nitrogen source (Fig.3A). This data suggest that the ammonium liberated as result of glutamate catabolism can not be totally assimilated by the GS activity. Also we found that AB2 strain acumulates 2-oxoglutarate when grows on M.M. supplemented with succinate plus ammonium (Fig.3B)

We proceed to determine the GS I and GS II activities during growth on MM with glutamate as nitrogen source. Figure 4B shows that AB2 mutant lacks GSII activity when grows on glutamate as nitrogen source. The GSs activities during the growth period on MM supplemented with NH_4Cl or KNO_3 was also determined. It is shown on figure 4C that this mutant lacks GSII activity when grows on NH_4Cl as nitrogen source and that it can induce only 20% of GSII activity when compared to the wild type strain when grown on nitrate as nitrogen source (fig.4D). The residual GSII activity induced in the mutant strain has a wild type sedimentation pattern on sucrose density gradients (data not shown). The catalitical properties of the AB2 GSII enzyme has been determined, and found that posses the same aparent Km for glutamate and the same thermosensibility as the wild type strain (data not shown).

Glutamine as nitrogen source did not revert the phenotype of

AB2 mutant, since it showed a doubling time similar to that of glutamate as nitrogen source (data not shown). However no differences were observed between the AB2 and the wild type strains when grown in M.M. supplemented with glutamine as carbon and nitrogen source and in the AB2 strain growing in M.M. supplemented with succinate and glutamine vs. glutamine as carbon and nitrogen source (data not shown).

To test if the AB2 strain has a problem in carbon oxidation, we proceeded to determine the glutamine consumption and the radioactive CO₂ release from uniformed label glutamine. In table 1 it is shown that AB2 mutant consumes 3 fold more glutamine than the wild type when grown on MM supplemented with succinate as carbon source and glutamine as nitrogen source.

It seems that the glutamine is used as carbon source since the CO₂ produced from glutamine oxidation was released at a rate 7 fold higher in the mutant than that found in the wild type strain and the ammonium excretion, product of glutamine catabolism was 16 fold higher in the mutant.

Nitrogen fixation phenotype of AB2 mutant.

After 21 days, AB2 strain induced formation of small-sized nodules. The nodulated plants showed stunted growth with yellowing foliage and the acetylene reduction activity observed was about 15-20%, when compared with plants inoculated with the wild type strain. However after 28 days the plants inoculated with AB2 strain now reduced wild type levels of acetylene (Fig.5). This is a typical fix delayed phenotype. It appears that the amount of fixed nitrogen available to the plant in this mutant does not suffice the nitrogen requirements of the plant.

To check that the fix delayed phenotype was not due to reversion of the Tn5 insertion mutation by precise excision of Tn5, we isolated bacteria from nodules induced by AB2. This nodules contained the mutant bacteria since retained Km resistance conferred by the Tn5 transposon.

Identification of the mutated gene in AB2 strain

In *B.japonicum* it has been reported that the *glnII* gene has the consensus promoter sequence of the promoters regulated by the Ntr system. In *R.meliloti* the *ntrA* gene is required for C₄-dicarboxylate transport as well for nitrate assimilation and for symbiotic nitrogen fixation. In order to find out if AB2 strain is affected in the Ntr system or in the *glnII* gene we cloned the EcoRI fragment of 15 Kb containing the Tn5 insertion into the unique EcoRI site of pBR329. The resultant plasmid pAB2 was used to hybridize in Southern experiments against total DNA digested with EcoRI from the mutant and the wild type strain. Figure 2B shows that the mutated gene hybridizes to a 9.3 Kb fragment in the wild type strain and to a 15 Kb fragment in total DNA from AB2. AB2 mutant is not affected in the GSII structural gene since the mutated gene does not hybridize to the GSII structural gene

from B. japonicum (data not shown).

Since the ntrA mutant of R. meliloti showed a pleiotropic phenotype similar to the one founded in AB2 mutant, the ntrA gene from R. meliloti was used in Southern blot experiments to hybridize it against total DNA from AB2 and CFN42 strains. We found two bands of hybridization against DNA from the wild type 3.6 Kb and 6.3 Kb. The same bands appeared when ntrA was hybridized against DNA from AB2 (data not shown).

The ntrA gene from R. meliloti was introduced into the AB2 mutant in order to see if this gene could complement the mutant phenotype. We found that the AB2 phenotype was not complemented by the ntrA gene from R. meliloti (data not shown).

In order to determine if the mutated gene from AB2 corresponds to the ntrC gene, we used the ntrC gene from R. meliloti as a probe in southern blot experiments against total DNA from AB2 and CFN42 strains. The same pattern of hybridization was observed in both strains (data not shown).

DISCUSSION

The mutant strain isolated in this work has a complex pleiotrophic phenotype. AB2 mutant is affected in its capacity to assimilate nitrate, ammonium and succinate, it is also affected in the induction of GSII activity and nitrogenase activity during symbiosis.

This phenotype is similar to the phenotype reported for the ntrA mutation in R. meliloti, however the ntrA mutation results in a complete lack of C₄-dicarboxylate transport, nitrate assimilation and nitrogen fixation (Ronson 1987). It was found that the AB2 mutant was not affected in the ntrA gene since none of the two hybridization bands founded when the total DNA from wild type strain was hybridized against the ntrA gene from R. meliloti corresponds in size to the EcoRI DNA fragment that contains the wild type gene (9.3 Kb). Besides the ntrA gene is unable to complement the AB2 phenotype.

The ntrC⁻ mutant strain described in R. meliloti (Szeto 1987) is unable to grow on nitrate as sole nitrogen source because it lacks nitrate reductase expression and have wild type expression of GSI. This mutant is able to grow in ammonium as nitrogen source. In this paper the GSII regulation was not considered. However it was reported that a ntrC⁻ mutation in Agrobacterium tumefaciens (which is taxonomically related to Rhizobia), lacks GSII activity (Rossbach 1987). The R. meliloti ntrC⁻ mutant strain shows wild type induction of nif genes during symbiosis but is unable to express nif genes explanta (Szeto 1987).

The AB2 mutant was shown not to be affected in the ntrC gene since no change in the hybridization pattern was found when total DNA of AB2 and CFN42 strain was hybridized against the ntrC gene from R. meliloti or Escherichia coli.

It was shown that AB2 mutant was not a structural mutant in the glnII gene, since the glnII gene from B. japonicum does not hybridize with the interrupted sequence of AB2 strain. Besides the residual GSII activity found in the mutant, has the same properties of the wild GSII enzyme. The GSII of the AB2 strain possess the same apparent Km for glutamate and the same thermosensibility.

Since we have shown that the AB2 mutation, was not a structural mutation in the ntrA, ntrC and glnII genes, this mutant could be affected in a different regulatory gene not described in Rhizobium species. This regulatory gene could be the ntrB, glnD or glnE genes, that in other bacteria species, have been shown that participate in the regulation of GS gene expression and in the expression of genes regulated by the Ntr system. The product of glnD is sensitive to changes in the ratio 2-oxoglutarate/glutamine. Further work is in progress to study the participation of this genes on GSII expression in Rhizobium

phaseoli.

The pleiotropic phenotype of AB2 mutant involved an alteration in carbon metabolism. The AB2 strain accumulates 2-oxoglutarate when grows on minimal medium supplemented with succinate and ammonium, something to be expected when the GSII activity is absent. Also the succinate utilization is affected since the CO₂ liberated from succinate is twofold lower as compared with the parental strain (data not shown). Besides in minimal medium supplemented with succinate and glutamine, the AB2 strain oxidate 7 fold more glutamine than the wild type, suggesting that glutamine is been utilized as carbon source.

These data could be explained if it is assumed that carbon oxidation by the TCA cycle is enhanced by the operation of the GS-GOGAT pathway. In this regard it has been reported that B. japonicum bacteroids oxidized succinate to glutamic acid (Salminen 1987), which implies the participation of GS-GOGAT activities.

The glutamate produced by this pathway, could be catabolized by the GABA-shunt, in which the glutamate is transformed to gamma-aminobutyric acid (GABA) by the glutamate decarboxylase activity, GABA in turn is converted to semialdehyde succinic acid and ammonium. The ammonium produced could be assimilated by the GSII enzyme. The presence of this glutamate catabolic pathway has been proposed in R. cowpea (Jin 1988), B. japonicum (Kouchi 1988) and R. meliloti (Fitzmaurice 1988). When glutamine synthesis was impaired as in the AB2 mutant, more glutamine can be derived for oxidation since its catabolic products, glutamate and ammonium, are less utilized for glutamine synthesis. By the same token a GS-GOGAT deficient operation would drive in a less active TCA cycling in the presence of succinate, something that may explain the fix delayed phenotype of AB2 mutant strain.

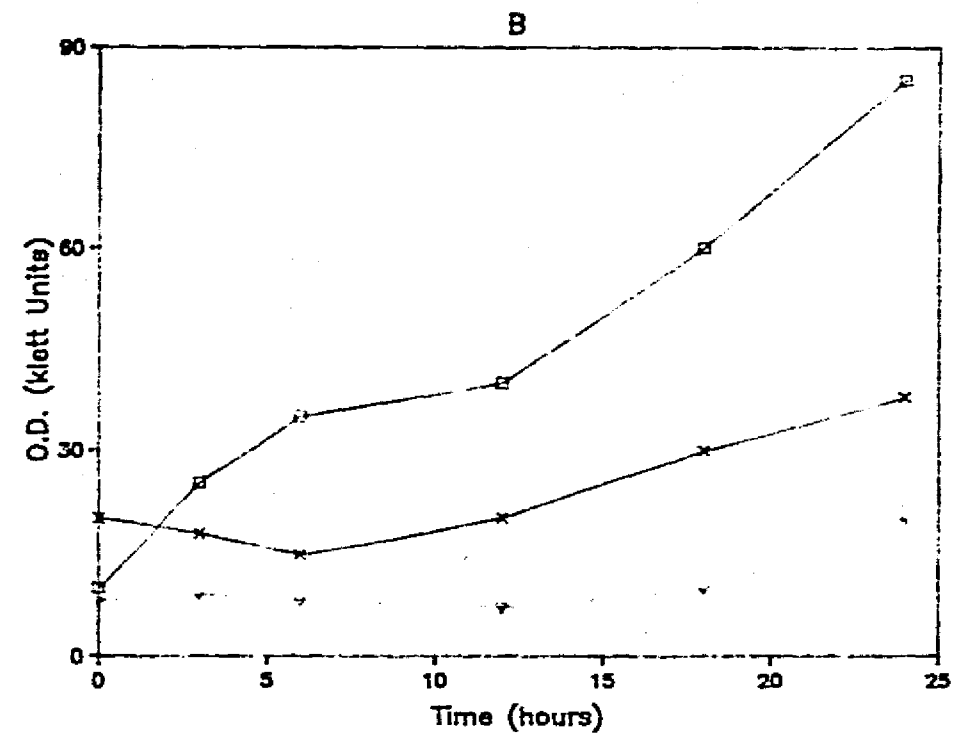
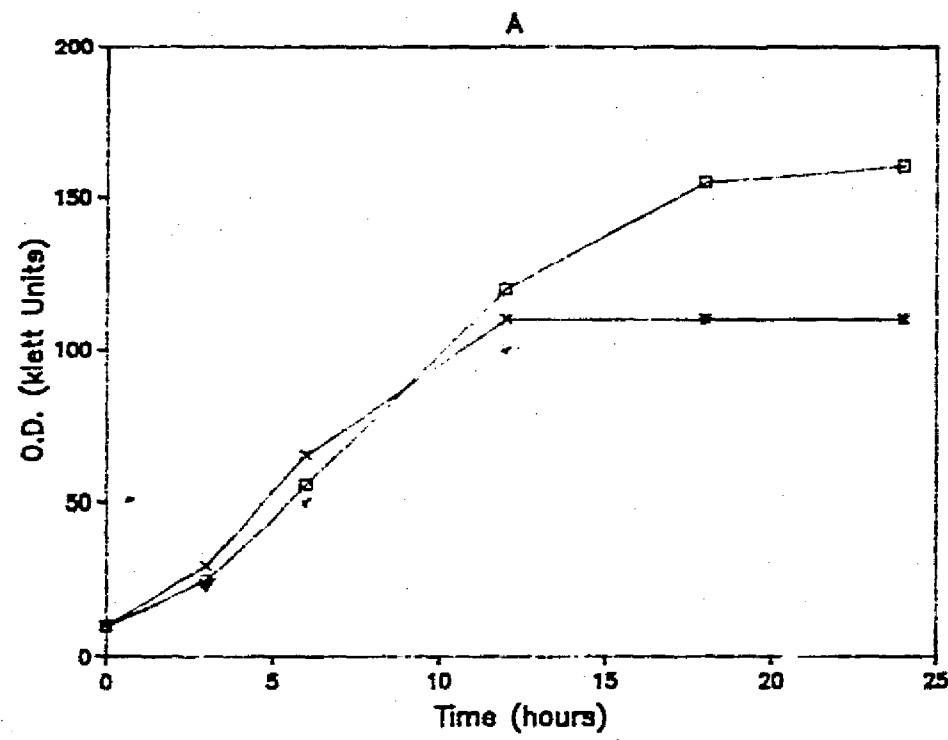


Figure 1.- Growth curves of Rhizobium phaseoli CE3 wild type and AB2 mutant strains on different nitrogen sources.
 A) CE3 wild type strain, B) AB2 mutant strain.
 □ glutamate, ▽ NH₄Cl, × KNO₃

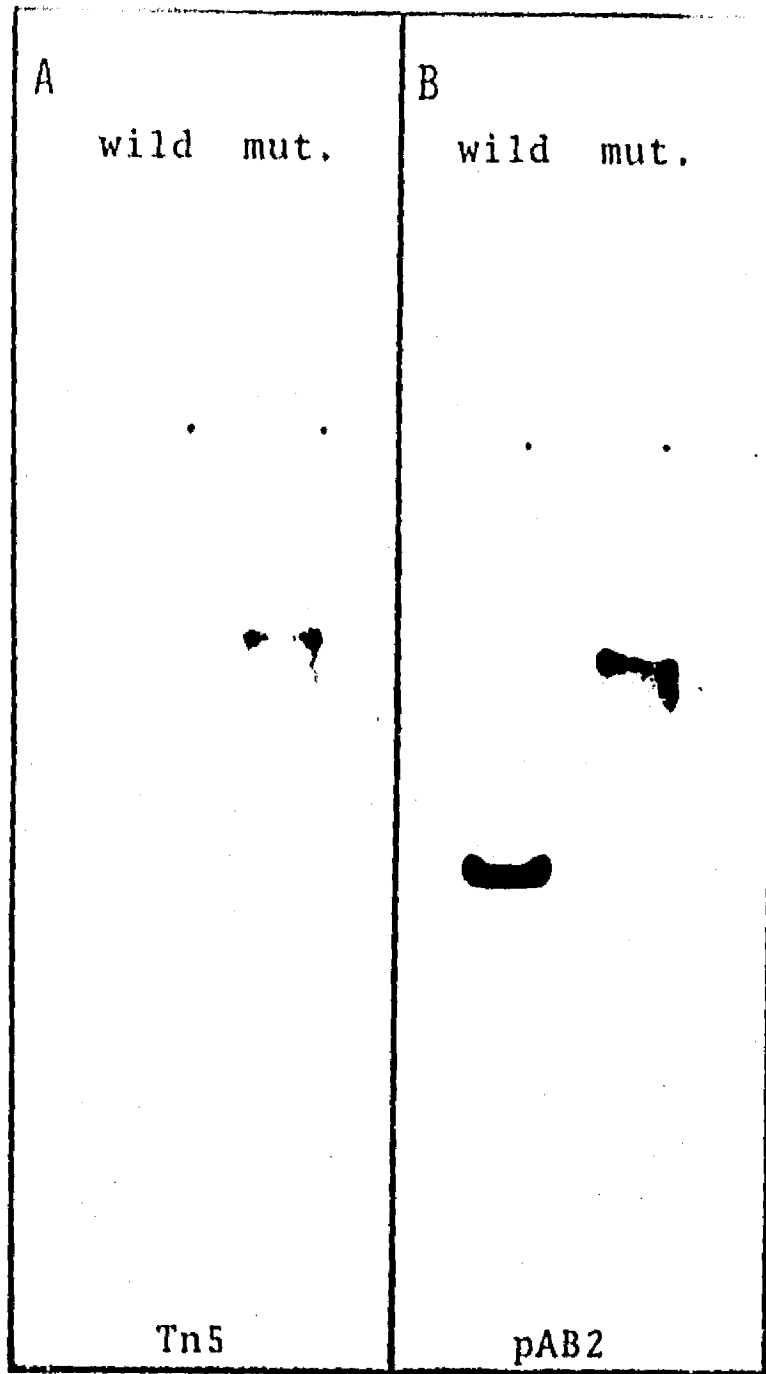


Figure 2.- Hybridization pattern of total DNA from Rhizobium phaseoli wild type and mutant strains, digested with EcoRI. A) Hybridization against Tn5, B) Hybridization against pAB2. Lane 1) CE3 wild type, Lane 2) AB2 mutant strain.

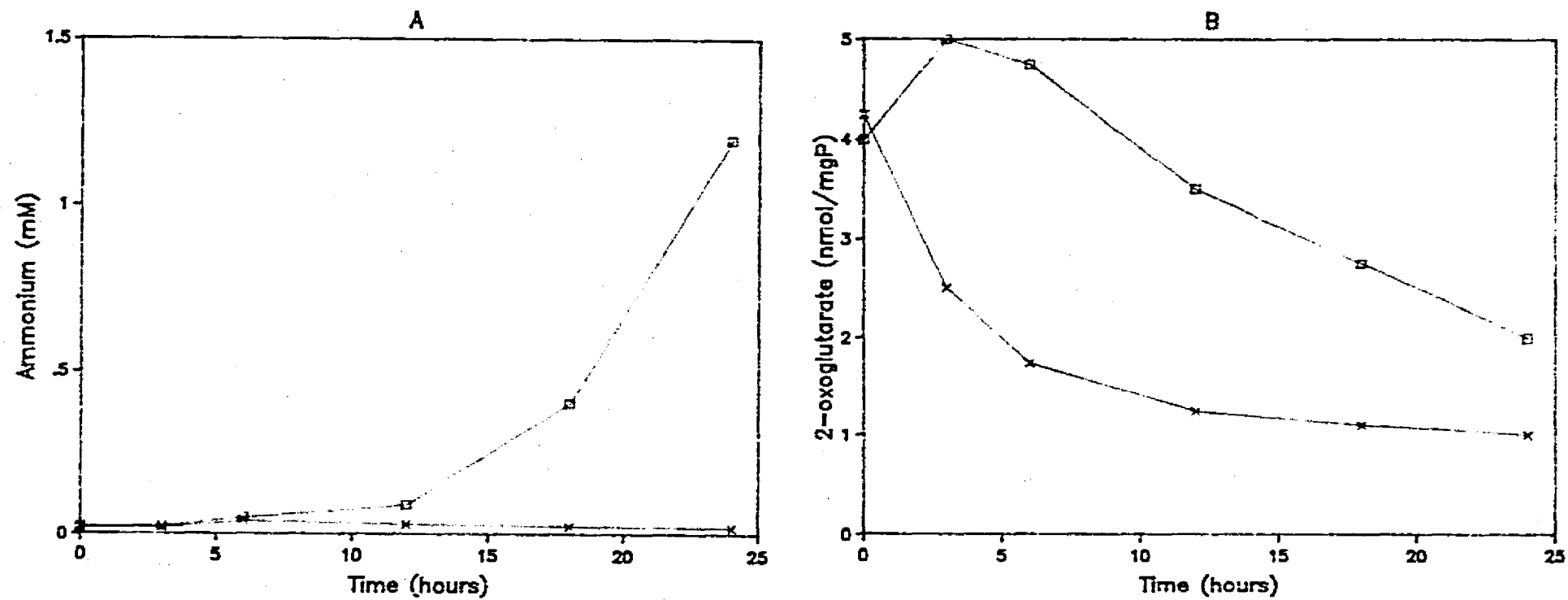


Figure 3.- Ammonium excretion and 2-oxoglutarate accumulation of *Rhizobium phaseoli* wild type and AB2 mutant strains.
 A) Ammonium excretion of cells grown on minimal medium supplemented with succinate and glutamate as carbon and nitrogen sources respectively.
 B) 2-oxoglutarate accumulation on cells grown on minimal medium supplemented with succinate and ammonium.
 x CE3 wild type strain, □ AB2 mutant strain.

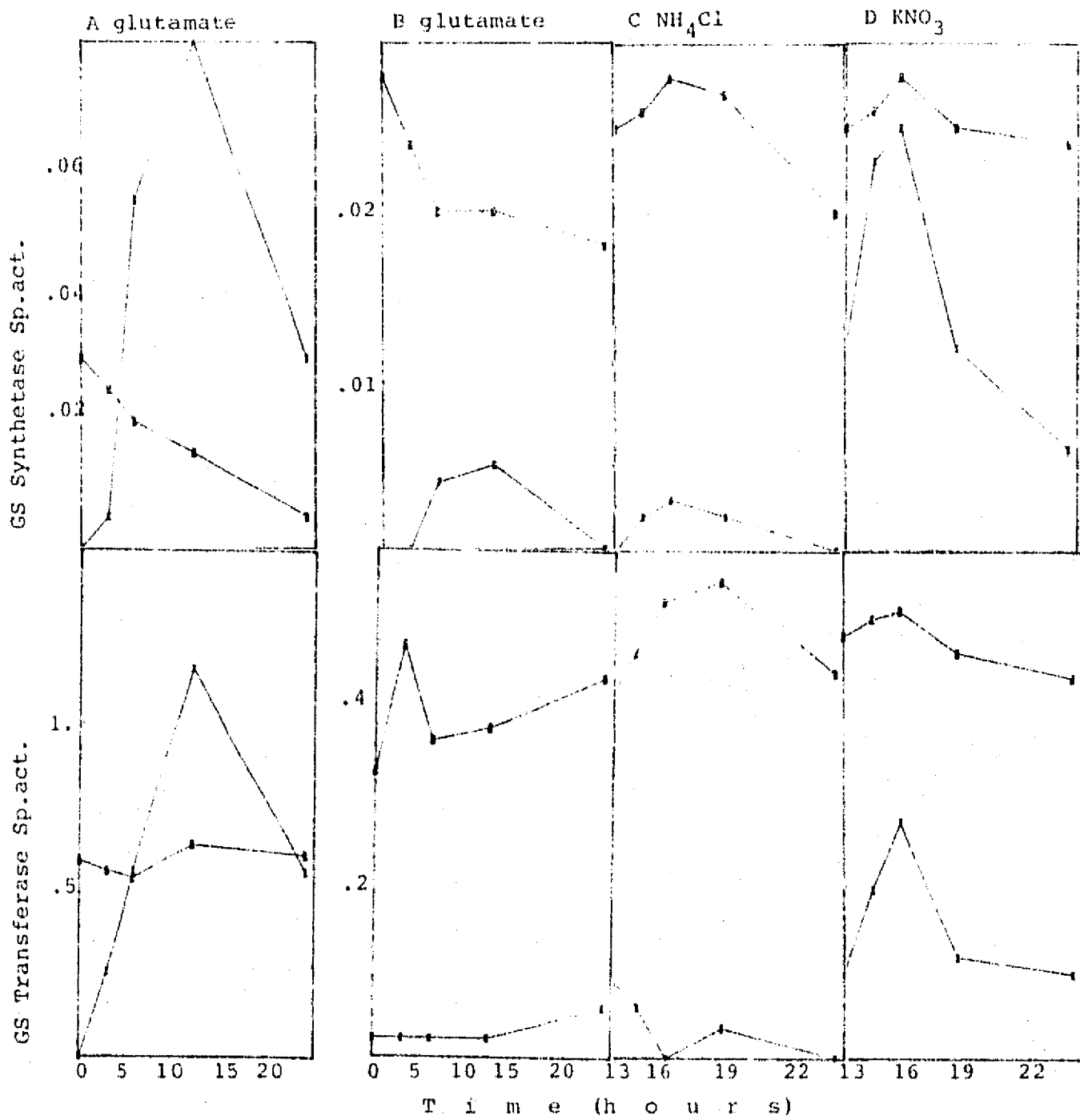


Figure 4.- GS I and GS II activities during growth of *Rhizobium phaseoli*: CE3 wild type and AB2 mutant strain, on minimal medium supplemented with different nitrogen sources. A) CE3 wild type strain grown on glutamate. B) AB2 mutant strain grown on glutamate. C) AB2 mutant strain grown on NH₄Cl. D) AB2 strain grown on KNO₃. \square GS I, \times GS II.

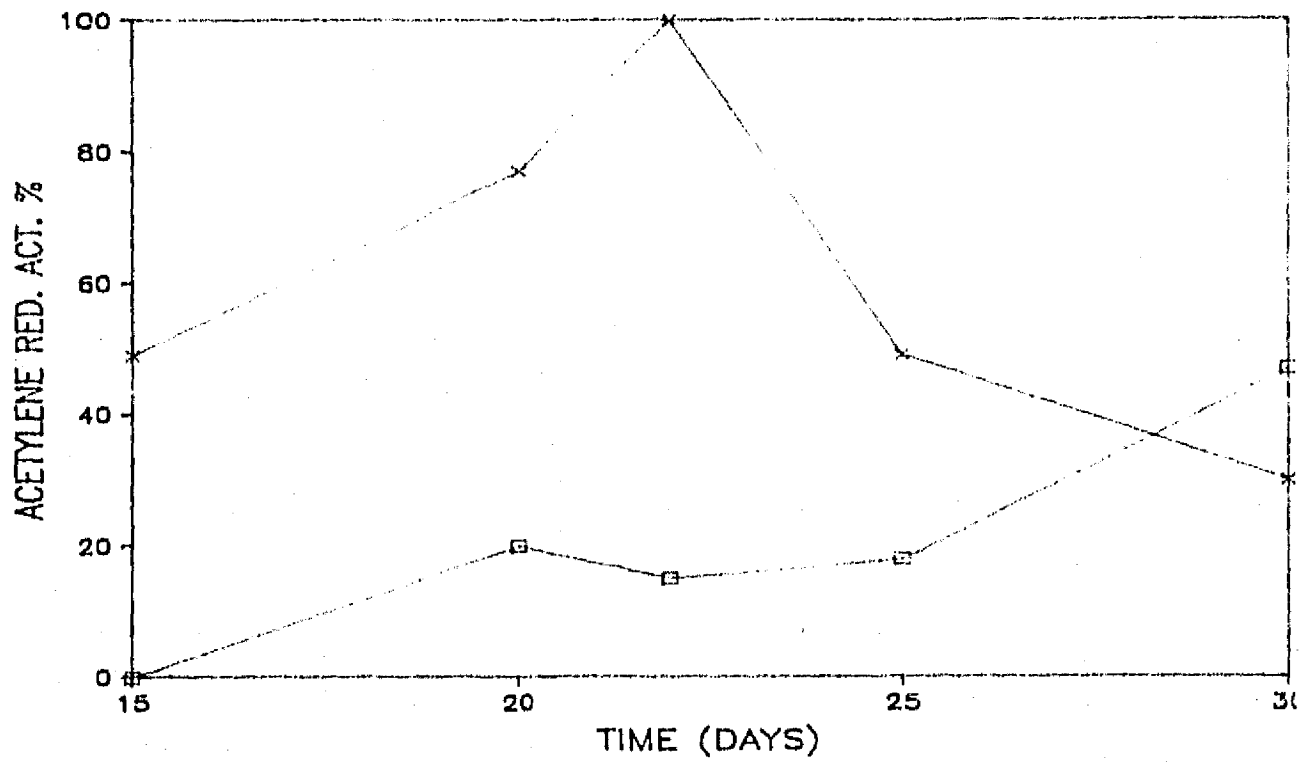


Figure 5.- Acetylene reduction activity in plants inoculated with CE3 wild type x and AB2 mutant □ strains. Each point represents the mean of five plants.

TABLE 1.- Glutamine consumption, ammonium excretion and $^{14}\text{CO}_2$ release from Rhizobium phaseoli CE3 wild type and AB2 mutant strains.

Strain	glutamine ^a consumption ($\mu\text{moles.mgP}^{-1}$)	ammonium ^a excretion ($\mu\text{moles.mgP}^{-1}$)	$^{14}\text{CO}_2$ ^b release (cpm. 10^6 .mgP ⁻¹)
CE3	13.0	1.1	0.2
AB2	44.0	18.0	1.4

Cells were grown on minimal medium supplemented with succinate and glutamine as carbon and nitrogen sources respectively.

^a The glutamine consumption was measured after 24 h of growth and the ammonium excretion after 12 h of growth.

^b The $^{14}\text{CO}_2$ released from glutamine was quantified after 1.5 h of incubation on [U- ^{14}C]glutamine (0.2 $\mu\text{ci/ml}$).

REFERENCES.

- 1.- Ow D.W., Sundarsan D.M., Rothstein S.E., Brown, F.M., Ausubel F. 1983. Promoters regulated by the *glnG* and *nifA* products share a heptameric consensus sequence in the -15 region. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **80** : 2524-2528.
- 2.- Bravo A, Mora J. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J.Bacteriol.* **170** : 980-984.
- 3.- Darrow R. 1980. Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. In J.Mora R.Palacios (ed) *Glutamine synthetase : metabolism, enzymology and regulation* Academic Press New York.
- 4.- Carlson T., Guerrinot M.L., Chelm B.K. 1985. Characterization of the gene encoding glutamine synthetase I (*gln A*) from *Bradyrhizobium japonicum* *J.Bacteriol.* **162** : 698-703.
- 5.- Carlson T.A., Marting G., Chelm B.K. 1987. Differential transcription of the two glutamine synthetases genes of *Bradyrhizobium japonicum* *J.Bacteriol* **169** : 5861-5866.
- 6.-Szeto W., Nixon T. Ronson C., Ausubel F. 1987. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene : *Rhizobium meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J.Bacteriol.* **169** : 1423-1432.
- 7.- Pawloski K., Ratet P., Schell J. deBruijn F. 1987. Cloning and characterization of *nifA* and *ntrC* genes of the stem nodulating bacterium ORS571 the nitrogen fixing symbiont of *Sesbania rostrata* : Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes in the free living versus symbiotic state. *Mol.Gen.Genet.* **206** : 207-219.
- 8.- Rossbach S., Schell J., deBruij F. 1987. The *ntrC* gene of *Agrobacterium tumefaciens* C58 controls glutamine synthetase GSII activity, growth on nitrate and chromosomal but not Ti-Encoded arginine catabolism pathways. *Mol. Gen.Genet.* **209** : 419-426.
- 9.- Carlson T.A., Chelm B.1986. Apparent eukaryotic origin of GS II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum* *Nature* **322** : 568-570.
- 10.- Ronson C., Nixon T., Albright L. Ausubel F. 1987. *Rhizobium meliloti ntrA (RpoN)* gene is required for diverse metabolic functions. *J.Bacteriol.* **169** : 2424-2431.
- 11.- Brewin N.J., Beringer J.E. Johnston A.W.B., 1980. Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J.Gen.Microbiol.* **120**: 413-420.

- 12.- Simon R., Priefer U. Puhler A 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in gram negative bacteria *Biotechnol.* **1**: 784-791.
- 13.- Quinto C., de la Vega H., Flores M., Fernandez L., Ballado L., Soberon G., Palacios R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli *Nature (London)* **299** : 724-726.
- 14.- Noel K.D., Sanchez A., Fernandez L., Leemans J., Cevallos M.A. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions *J.Bacteriol* **158** : 148-155.
- 15.- Bender R.A., Janssen K.S., Resnick A.D., Blummenberg M., Foor F., Magasanik B. 1977. Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes *J.Bacteriol.* **129** : 1001-1009
- 16.- Bravo A., Becerril B., Mora J. 1988. Introduction of the Escherichia coli gdhA gene into Rhizobium phaseoli : Effect on nitrogen fixation *J.Bacteriol* **170** : 985-988.
- 17.- Fitzmaurice A.M., O'Gara F. 1988. Involvement of glutamate as carbon source in supporting nitrogen fixation activity in Rhizobium meliloti. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proceedings of the 7th international congress on nitrogen fixation. H.Bothe, F.J. de Bruijn and W.E. Newton (ed) pp.558
- 18.- Kouchi H., Fukai K. 1988. Uptake and metabolism of aspartate and glutamate by soybean nodule bacteroids. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proceedings of the 7th international congress on nitrogen fixation. H.Bothe, F.J.deBruijn and W.E.Newton (eds). pp 561
- 19.- Jin H.N., Glenn A.R., Dilwoth M.J. 1988. Metabolism of 4-aminobutirate (GABA) by cowpea Rhizobium MNF2030. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proceedings of the 7th international congress on nitrogen fixation. H.Bothe, F.J. deBruijn and W.E.Newton (eds). pp 560
- 20.-Rossbach S., Schneider M., Schell S., deBruijn F.j. 1988. Characterization of different glutamine synthetases genes of the Rhizobiaceae and their role in N-assimilation and plant bacterial interactions. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proceedings of the 7th international congress on nitrogen fixation. H.Bothe, F.J. deBruijn and W.E. newton (eds). pp 383.

DISCUSION

La fijación de nitrógeno efectuada por Rhizobium, dentro de los nódulos de las raíces de plantas leguminosas, es el resultado de una serie de procesos específicos que involucran la diferenciación de los dos participantes de la simbiosis (la planta y la bacteria). Los nódulos maduros contienen células vegetales llenas de bacteroides capaces de fijar nitrógeno. Los bacteroides están envueltos en bolsas de membrana de origen vegetal y por lo tanto están separados del citosol vegetal.

La simbiosis no es un evento azaroso, que se dé de diferentes maneras, sino que es un proceso regulado de una forma coordinada y precisa, en donde se intercambian una serie de señales entre los dos participantes, que activan una serie de respuestas, para dar como resultado final, la formación de nódulos efectivos en la fijación de nitrógeno.

Entre los procesos que se llevan a cabo en esta interacción podemos mencionar los siguientes :

1.- Reconocimiento entre la planta y la bacteria.- Incluso se podría hablar de un llamado o atracción hacia la planta (invitación a la nodulación). Respecto a esto se ha descrito que las raíces de las plantas excretan diferentes compuestos, identificándose a ciertos compuestos flavonoides como inductores específicos de genes nod de la bacteria (123). También se ha reportado la existencia de exudados vegetales, que actúan como anti-inductores de la expresión de los genes nod(124). La liberación de estos compuestos seguramente se lleva a cabo de una manera regulada en diferentes lugares de la raíz.

2.- Infección e inducción de la nodulación.- Lo cual incluye desde el pegado de la bacteria a la raíz, penetración de la bacteria por el pelo radicular hasta la formación del hilo de infección y del nódulo. Se ha reportado que Rhizobium produce polisacaridos de superficie, que son importantes durante la infección. Mutantes afectadas en la producción de diferentes polisacaridos presentan un fenotipo Inf^- , que se caracteriza por formar nódulos vacíos que no presentan hilo de infección ni bacteroides (125). Se propone que los lipo-polisacaridos funcionan como señales durante la infección o como componentes estructurales de la formación del hilo de infección y que tienen un papel en las interacciones célula-célula entre la bacteria y la planta. Por otro lado también se ha demostrado, que una cepa silvestre de R. meliloti, puede inducir la formación de nódulos vacíos, cuando las bacterias son separadas de la raíz por un filtro. Este dato implica que la formación del nódulo está inducida por un producto difusible proveniente de la bacteria (125).

3.- El desarrollo del nódulo maduro.- que involucra la diferenciación de la bacteria y de la célula vegetal infectada, donde ocurren muchos eventos, como son la formación de la membrana peribacteroidal, cambios en el retículo endoplásmico, el aparato de golgi, la mitocondria y la inducción de nodulinas en

el espacio citosólico y peribacteroidal.

Es en este punto en donde existe un intercambio de carbono y nitrógeno entre ambos participantes. El bacteroide proporciona el amonio producto de la fijación de nitrógeno y la planta provee de metabolitos de carbono para la producción de energía en el bacteroide.

La diferenciación a bacteroide es un proceso del cual se entiende muy poco. Se sabe que los bacteroides cambiaron su metabolismo de carbono y nitrógeno. Los bacteroides se encuentran envueltos por la membrana peribacteroidal, la cual tiene una permeabilidad selectiva, de tal manera que el bacteroide recibe solo ciertos compuestos. Se puede suponer que en el bacteroide se expresan sólo los sistemas necesarios para metabolizar estos compuestos. Se ha reportado que son incapaces de utilizar disacáridos y hexosas y que mutantes en el metabolismo de hexosas nodulan y fijan nitrógeno igual que la cepa silvestre (126). Por otro lado se ha visto que los bacteroides de diferentes especies, son muy eficientes en oxidar ácidos orgánicos y que mutantes en el transporte de ácidos dicarboxílicos presentan un fenotipo $\text{Nod}^+ \text{Fix}^-$ (118). En base a estos datos, se propuso que estos eran los esqueletos de carbono que la planta provee al bacteroide. Pero posteriormente se han propuesto otros modelos de intercambio de nutrientes entre la planta y el bacteroide. Como el propuesto por M.Kahn (122), donde propone que el intercambio de nutrientes puede ser semejante a la bomba de malato-aspartato de mitocondrias. Esta proposición consiste en que malato y glutamato entran al bacteroide, en un cambio por α -cetoglutarato y aspartato. El malato es oxidado dentro del bacteroide, para dar oxalacetato el cual transamina con glutamato para dar aspártico. El α -cetoglutarato transamina en la planta con aspártico para dar glutamato. El resultado neto de esta vía es la transferencia de NADH al bacteroide (Fig. 8)

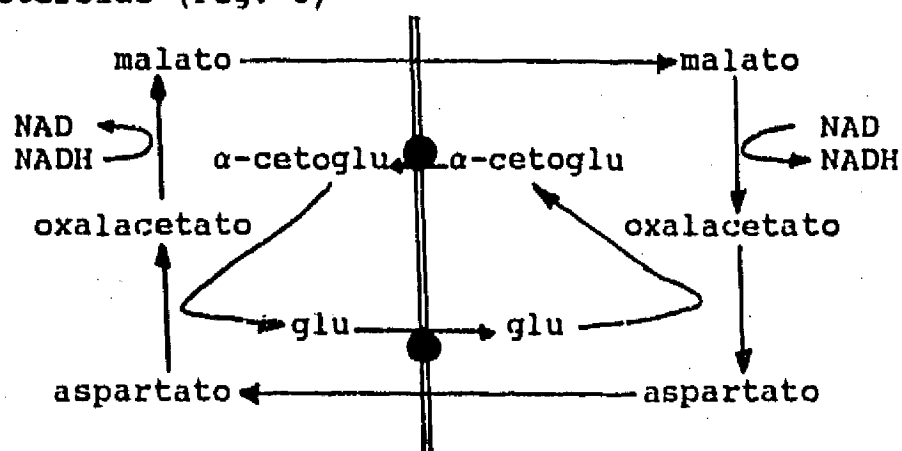


Figura 8.- Modelo de intercambio de nutrientes entre el bacteroide y la planta, propuesto por M.Kahn (122).

Posteriormente se aislaron mutantes que no catabolizan glutamato y se ha visto que están afectadas en la fijación de nitrógeno (127). Por otro lado se reportó que los bacteroides importan glutamato y aspartato (120,128) y que este transporte no compete con el de ácidos dicarboxílicos. También se reportó

que existe una poza de glutamato en los bacteroides y que si estos se alimentan con ^{14}C -succinato, el producto que se marca principalmente es el glutamato (120).

Resulta lógico pensar que los metabolismos de carbono y nitrógeno de la bacteria, juegan un papel fundamental durante el desarrollo de los procesos mencionados, hacia el establecimiento de la simbiosis. Se ha reportado que la presencia de una fuente de nitrógeno convalidado en el suelo, suprime la nodulación (129). Se ha visto que el amonio reprime la expresión de genes nod de la bacteria. Incluso se ha reportado, que los genes del sistema general de nitrógeno ntrA y ntrC juegan un papel muy importante en la expresión del gen nodC (129).

Rhizobium debe de estar en un estado metabólico especial para responder a las señales de la planta. Incluso desde el primer evento de reconocimiento y atracción. El estudio del metabolismo de carbono y de nitrógeno de la bacteria en vida libre, podrá dar a conocer como responde la bacteria a diferentes cambios en el medio ambiente, como regula sus enzimas de asimilación de amonio y de utilización de carbono, en respuesta a diferentes señales. Esto nos podría llevar a proponer, que pudiera ser posible simular las señales de la planta durante la simbiosis y lograr diferenciar a Rhizobium fuera de la planta. Así para entender cual o cuales son las señales, que inducen todos estos cambios en Rhizobium, lo primero es estudiar el metabolismo de carbono y nitrógeno de la bacteria en vida libre.

En el primer trabajo presentado en esta tesis, se presenta un estudio fisiológico de la asimilación de amonio de Rhizobium phaseoli en vida libre.

En este trabajo se estableció que la vía GS-GOGAT es la ruta de asimilación de amonio en R. phaseoli. En esta vía participan las enzimas GSI, GSII y GOGAT.

Las dos enzimas de glutamino sintetasa, presentes en este microorganismo, se regulan de manera recíproca. Ya que en condiciones donde la GSI esta activa, la GSII se encuentra muy baja y en condiciones donde la GSII se induce, la GSI reprime su actividad. La GSI es una enzima termoresistente, de peso molecular mayor que la GSII. En este trabajo se encontró que la GSI se sintetiza constitutivamente durante todo el ciclo de crecimiento en las diferentes fuentes de nitrógeno probadas, ya que la actividad de transferasa se mantiene constante. La actividad de la GSI solamente es modulada por el sistema de regulación postraduccional de adenilación. La actividad de la GSI se inactiva cuando las células se crecen en medio mínimo, sin importar cual es la fuente de nitrógeno, en cambio la inducción de la GSII responde a la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo. Este dato sugiere que la GSII de R. phaseoli pudiera estar regulada por el sistema general de nitrógeno (Ntr), tal y como se ha reportado para la GSII de Bradyrhizobium japonicum (106), R. meliloti (95) y Agrobacterium (112). La GSII en R. phaseoli es una enzima que alcanza niveles muy altos de inducción. Hemos observado que

cuando ésta actividad disminuye, por ejemplo al final del crecimiento en medio mínimo de la cepa silvestre o en una mutante afectada en la actividad de GSII, se excreta amonio al medio.

La actividad biosintética de estas dos enzimas responde a los niveles intracelulares de α -cetoglutarato y glutamina, lo que significa que la relación carbono/nitrógeno, determina la regulación de las dos glutamino sintetetasas de R. phaseoli. Cuando la relación α -cetoglutarato/glutamina decrece, la GSI es adenilada, con lo que pierde su actividad biosintética. Cuando la GSI es inactivada, la GSII se induce. Esta respuesta en cuanto a la adenilación de la GSI cuando disminuye la relación α -cetoglutarato/glutamina es muy semejante a lo encontrado en la regulación de la GS de E. coli y K. pneumoniae por el sistema de adenilación (20). Aunque podemos marcar una diferencia, que en Rhizobium la relación α -cetoglutarato/glutamina es muy alta en medio rico. Mientras que en E. coli en medio rico, la actividad de GS es muy baja y esta muy adenilada, lo que significa que la relación α -cetoglutarato/glutamina es totalmente opuesta.

Hemos observado que la inducción de la GSII esta directamente relacionada con la velocidad del cambio en la relación α -cetoglutarato/glutamina, es decir que cuando esta relación disminuye lentamente, la GSII se induce a niveles muy altos, mientras que, cuando disminuye muy rápidamente, como ocurre durante el crecimiento en amonio o en glutamina, los niveles de GSII son muy bajos. La relación α -cetoglutarato/glutamina también disminuye muy rápidamente cuando se agrega un exceso de amonio, a un cultivo con la GSII inducida, como es el caso del crecimiento en glutamato como fuente de nitrógeno. En estas condiciones la disminución en la relación α -cetoglutarato/glutamina va acompañada con una disminución en la actividad de GSII. La actividad de GSII se pierde a una velocidad mayor de lo que se perdería por simple dilución durante el crecimiento. Este dato nos sugiere la existencia de un sistema de inactivación postraduccional de la GSII.

La inactivación de la GSII al agregar un exceso de amonio es un proceso irreversible, ya que no se recupera actividad de GSII al regresar las células a un medio de derepresión después del shock de amonio. Posiblemente este sistema de inactivación de la GSII este relacionado con las pozas intracelulares de poder energético y reductor, ya que al añadir un exceso de glutamina a un cultivo con la GSII inducida, la GSII también disminuye pero esta disminución no es irreversible, ya que la actividad de la GSII se recupera completamente al transferir las células a un medio de derepresión. En el caso de un shock de glutamina la relación α -cetoglutarato/glutamina disminuye, por que aumenta la poza intracelular de glutamina, pero la poza de poder energético y reductor no tiene porque variar, ya que esa glutamina acumulada proviene del exterior y no es el resultado de la acción de la GS con el consecuente consumo de ATP.

Por último quisiera señalar que cuando las células alcanzan la fase preestacionaria, la GSII disminuye hasta niveles muy bajos. Sabemos que la inactivación de la GSII al final del crecimiento también es un proceso irreversible, ya que si las células se diluyen en un medio de derepresión, la actividad de la

GSII tampoco se recupera y lo que es más estas células son incapaces de crecer (datos no presentados en la tesis). El hecho de que la GSII se inactive al final del crecimiento, nos sugiere, que intracelularmente se están dando las mismas condiciones, que cuando se agrega un exceso de amonio, es decir depleción de las pozas de α -cetoglutarato y ATP. Esto podría surgir simplemente por un desacoplamiento entre el flujo de carbono y el de nitrógeno, ya que la GSII es una enzima con una actividad muy elevada. De tal manera que pudiera estar drenando esqueletos de carbono y consumiendo una gran cantidad de energía en la síntesis de glutamina.

En el laboratorio del Dr. Jaime Mora, se ha determinado la poza de poder energético de diferentes cepas de Rhizobium, en diferentes condiciones de cultivo (comunicación personal). Se ha encontrado que cepas que expresan niveles muy altos de GSII, tienen una poza de ATP muy baja. Mientras que cepas con niveles bajos de GSII presentan lo contrario. Este dato apoya la proposición de que en la inactivación de la GSII al final del crecimiento en medio mínimo, se presenta la señal de baja carga energética.

El sistema de inactivación de la GSII propuesto en este trabajo, es el primer sistema de regulación postraducciona propuesto en el género Rhizobium y pudiera tener una importancia fundamental en la simbiosis o durante la diferenciación a bacteroide, ya que es un sistema de inactivación irreversible y cuando ocurre las células excretan amonio y dejan de crecer. En Bradyrhizobium japonicum se ha reportado la existencia de transcripción del gen glnII en los bacteroides y sin embargo no se detecta actividad de esta enzima (111). Posiblemente la ausencia de actividad de GSII en los bacteroides, se debe al funcionamiento de este sistema de inactivación de la GSII. Sería muy interesante aislar mutantes deficientes en este sistema de inactivación y estudiar el fenotipo simbiótico, cuando se presenta una alteración en la regulación de la actividad de GSII.

Con este trabajo hemos establecido que la única vía de asimilación de amonio en Rhizobium phaseoli es la vía GS-GOGAT, nos preguntamos si es imprescindible que la bacteria asimile el amonio por esta vía, para el desarrollo de una nodulación efectiva. También por qué no existe otra manera de sintetizar glutamato y qué pasaría si Rhizobium tuviera otro punto de asimilación de amonio, como es a través de la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH). En el segundo trabajo presentado en esta tesis, presento la clonación del gen gdhA de E. coli en un plásmido replicable en Rhizobium y la caracterización de una cepa de Rhizobium phaseoli que expresa la actividad de GDH.

En este trabajo se describe que una cepa de R. phaseoli con actividad de GDH, esta afectada en su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Al respecto se pueden pensar dos razones por las cuales la fijación de nitrógeno esta alterada en esta cepa. Una explicación sería que la actividad de GDH este drenando

esqueletos de carbono hacia la síntesis de glutamato, alterando el funcionamiento del metabolismo de carbono de los bacteroides y otra que compita por el poder reductor con la nitrogenasa. También se podría proponer que al alterar la asimilación de amonio de las bacterias, se altere también el proceso de diferenciación a bacteroide y que los nódulos con bacterias GDH⁺ contienen células que no se han terminado de diferenciar y que por lo tanto no están listas para fijar nitrógeno.

En este trabajo se demostró que la asimilación de amonio por la vía GS-GOGAT, es fundamental para el establecimiento de la simbiosis, ya que las plantas inoculadas con la cepa GDH⁺ de R. phaseoli, fueron infectadas preferencialmente por bacterias que habían perdido la actividad de GDH. Estos datos sugieren que las plantas son capaces de seleccionar bacterias con una vía de asimilación de amonio específica. Al momento no podemos saber en que punto de la interacción planta-bacteria este afectado. Una posibilidad es que las bacterias GDH⁺ sean incapaces de infectar a las plantas y que la poca frecuencia de nódulos inducidos por la cepa GDH⁺ se deba a un efecto sinérgico por la presencia de bacterias GDH⁻. Otra alternativa sería que el proceso de infección y nodulación sea mucho más lento o deficiente en las cepas GDH⁺ y que por un efecto de competencia ganen las bacterias GDH⁻. Una manera de discernir entre las diferentes alternativas es la clonación del gen gdhA en un sitio estable dentro del cromosoma de R. phaseoli, a fin de evitar la pérdida de esta información durante el proceso de nodulación. Al respecto se realizó la clonación de este gen, en una de las reiteraciones del gen estructural de la nitrogenasa reductasa, utilizando el plásmido pLS151 que lleva clonado la reiteración nifHA de la cepa CFN42. Por el momento se están buscando las cepas homogenotizadas con el gene nifH interrumpido con el gene estructural de la GDH de E. coli. Esta cepa servirá para establecer la importancia de asimilar el amonio únicamente por la vía GS-GOGAT, en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno.

Por último queda abierta la pregunta de porque existen dos enzimas de glutamino sintetasa en Rhizobium. Así como si alguna de las dos enzimas es necesaria para el proceso de diferenciación o de nodulación. Se ha propuesto que el gen que codifica para la GSII tiene un origen vegetal, dada la gran homología con la GS de plantas (102). Nosotros nos preguntamos porque se dió esta transferencia génica de la planta a la bacteria y si esto tiene alguna relación con el desarrollo de la simbiosis. A fin de estudiar el papel que desempeña la GSII en el crecimiento de Rhizobium en vida libre, así como en el establecimiento de una simbiosis efectiva, se aisló una mutante afectada en la actividad de la GSII. Los resultados de este trabajo se presentan en el manuscrito titulado "Isolation and characterization of a Tn5 induced mutant of Rhizobium phaseoli affected in the GSII activity and nitrogen fixation". El cual será enviado a publicación. En este trabajo se presenta el aislamiento de la mutante AB2, la cual está causada por una sola inserción del transposón Tn5. Esta mutante tiene un fenotipo muy complejo :

a) Esta mutante está afectada en su capacidad de expresar la ac-

tividad de GSII.

b) Presenta alteración en la utilización de succinato como fuente de carbono.

c) Presenta una alteración en la inducción de la fijación de nitrógeno. (fenotipo Fix retardado)

Este fenotipo es muy parecido al fenotipo reportado por la mutante en ntrA de R.meliloti, pero a diferencia de la mutante AB2, las mutantes descritas en este gen presentan ausencia total del transporte de dicarboxílicos, de actividad de nitrato reductasa y de nitrogenasa. En este trabajo se mostró que al realizar hibridizaciones tipo Southern, de DNA total de las cepas mutante AB2 y silvestre CFN42, contra el gene estructural de ntrA de R.meliloti, el patrón de hibridización es el mismo en las dos cepas, lo que significa que el transposón Tn5 no está integrado en el gene ntrA. Además al introducir el gene de ntrA de R.meliloti en la mutante AB2 no se complementó el fenotipo presentado por esta mutación.

Por otra parte sabemos que la mutación de la cepa AB2, no es una mutación estructural en el gene de la GSII, ya que la GSII que se logra detectar en la mutante durante el crecimiento en nitrato, presenta la misma Km aparente por glutamato y la misma curva de sensibilidad a la temperatura, presentadas por la GSII de la cepa silvestre. Además el gene glnII de Bradyrhizobium japonicum no hibridiza con el fragmento de DNA de 15Kb de la mutante que lleva la inserción de Tn5.

Por otro lado se ha reportado que las mutantes en el gene ntrC de R.meliloti, son incapaces de crecer en nitrato, presentan una inducción normal de la GSI y una alteración en la expresión de la GSII (101). Sin embargo no se ha reportado el fenotipo de la mutante ntrC en cuanto a su capacidad de utilizar succinato. Esta mutante presenta una inducción normal de la fijación de nitrógeno en simbiosis, pero es incapaz de expresar estos genes explanta. Con el fin de encontrar si la mutante AB2 está afectada en este gen, se realizaron experimentos de hibridización tipo Southern, de DNA total contra detectores de ntrC de E.coli y de R.meliloti. Encontramos que la mutación AB2 tampoco está localizada en este gen, ya que los patrones de hibridización no están modificados en la cepa mutante.

Otra alternativa, es que la mutante AB2 está afectada en un gen regulatorio no descrito en Rhizobium, como podría ser en el gene ntrB. En Klebsiella y en E.coli se ha reportado que el producto del gene ntrB, codifica para una proteína que fosforila o desfosforila al producto de ntrC, para activarlo o inactivarlo. Mutaciones en ntrB presentan un fenotipo bajo constitutivo para la síntesis de GS. Por otro lado como se mencionó en la introducción la actividad del producto de ntrB está modulada por las proteínas PII y uridiltransferasa, codificadas por los genes glnB y glnD respectivamente. Mutaciones descritas en Klebsiella en estos dos genes, pueden producir fenotipos alterados en la síntesis de GS y en la expresión de genes regulados por el sistema Ntr.

Cabe señalar que la mutante AB2 además de estar afectada en la expresión de la GSII, está afectada en la adenilación de la

GSI, cuando crece en medio mínimo. Ya que la actividad de GSI no pierde completamente su actividad biosintética, como ocurre en la cepa silvestre. Este dato es de esperarse, dado el cambio en la relación α -cetoglutarato/glutamina, que se observa en esta mutante. La cepa AB2 acumula α -cetoglutarato cuando crece en medio mínimo, por lo cual esta relación se mantiene mucho más alta.

Existe la posibilidad de que la mutación de la cepa AB2, únicamente afecte la utilización de succinato como fuente de carbono y que esta alteración en el metabolismo de carbono, sea lo suficientemente importante, como para producir los demás efectos colaterales en el fenotipo de esta cepa. Así la baja asimilación de succinato, produciría cambios en la relación de los diferentes intermediarios del ciclo de Krebs y esto repercutiera en la inducción de la síntesis de GSII.

Por último, existe la posibilidad, de que la actividad de GSII sea importante en la oxidación de succinato, es decir que el funcionamiento del ciclo de Krebs sea estimulado por la vía GS-GOGAT. Se ha reportado que bacteroides de B. japonicum, oxidan el succinato hasta ácido glutámico (120), lo cual implica la participación de la vía GS-GOGAT. Por otra parte se demostró, que el catabolismo del ácido glutámico es importante para la fijación simbiótica de nitrógeno en R. meliloti (127). El glutamato producido por la vía GS-GOGAT puede ser catabolizado de varias maneras, una de ellas es la vía de GABA, la cual ha sido propuesta en otras especies de Rhizobium (127,128,130,). En esta vía el glutámico es transformado a ácido α -aminobutírico (GABA) por la glutamato descarboxilasa, el GABA a su vez es convertido en semialdehído de ácido succínico y amonio. El amonio producido sería asimilado por la actividad de la GSII. Esto implica la existencia de un ciclo de síntesis y degradación de glutamina, fundamental para mover el carbono del ciclo de Krebs (Fig.9)

Como la mutante AB2 está afectada en la síntesis de glutamina, con este modelo se puede explicar, que se acumule α -cetoglutarato cuando crece en medio mínimo (succinato más amonio), debido a la falta de glutamina que se requiere para drenar este metabolito. También se puede explicar por qué la mutante utiliza más glutamina que la cepa silvestre cuando crece en medio mínimo (succinato más glutamina), ya que los productos del catabolismo de glutamina, glutamato y amonio no pueden ser utilizados para la síntesis de glutamina.

El aislamiento de mutantes estructurales en la actividad de GSII, así como mutantes en la glutamato descarboxilasa y en la deshidrogenasa de semialdehído succínico, permitirá demostrar la participación de este ciclo de síntesis y degradación de glutamina en el funcionamiento del ciclo de Krebs. Por el momento podemos señalar que mutantes afectadas en la degradación de glutamato así como mutantes en GOGAT descritas en otros Rhizobium, han resultado en un fenotipo Fix⁻.

El estudio de la asimilación de amonio en vida libre, resultó ser importante para comprender las estrategias que tiene esta bacteria, para manejar el nitrógeno y poder establecer una

simbiosis efectiva. Podemos decir que la vía de asimilación de amonio GS-GOGAT, ha sido seleccionada en esta interacción y el alterar esta ruta repercute en el proceso simbiótico.

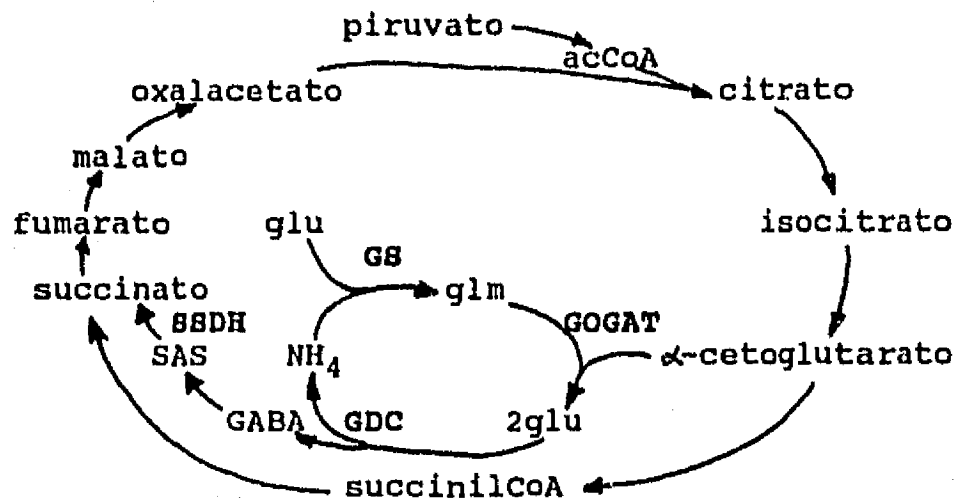


Figura 9.- Modelo del ciclo de la glutamina integrado al ciclo de Krebs. (GS) glutamino sintetasa, (GOGAT) glutamato sintasa, (GDC) glutamato descarboxilasa, (SSDH) deshidrogenasa de semialdehido succinico. (SAS) semialdehido succinico, (GABA) acido gamma-aminobutirico.

- 1.- Whinter H.C., Burris R.H. 1976. Nitrogenase Ann. Rev. Biochem. 45 : 409-426.
- 2.- Kanamori K., Weiss R.L., Roberts J.D. 1987. Role of glutamate deshydrogenase in ammonia assimilation in nitrogen fixing Bacillus macerans. J. Bacteriol. 169 : 4692-4695.
- 3.- Brenchley J.E., Prival M.J., Magasanik B. 1973. Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in Klebsiella aerogenes. J. Biol. Chem. 218 : 6122-6128.
- 4.- Bender R.A., Janssen K.A., Resnick A.D., Blumenberg M., Foor F., Magasanik B. 1977. Biochemical parameters of glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 129: 1001-1009.
- 5.- Gaillardin C.M., Magasanik B. 1978. Involvement of the product of the glnF gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 133 : 1329-1338.
- 6.- Hirschman J., Wong P.K., Sci K., Keiner J., Kustu S. 1985. Products of nitrogen regulatory genes ntrA and ntrC of enteric bacteria activate glnA transcription in vitro : evidence that the ntrA product is a σ factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7525-7529.
- 7.- Gussin G., Ronson C.W., Ausubel F.M. 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. Annu. Rev. Genet 20 : 567-591.
- 8.- deBruijn F.J., Ausubel F. 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.
- 9.- Merrick M.J. Stewart D. 1985. Studies on the regulation and function of Klebsiella pneumoniae ntrA gene. Gene 35: 297-303.
- 10.- Gaillardin C.M., Magasanik B. 1978. Involvement of the product of the glnF gene in the autogenous regulation of glutamine synthetase formation in Klebsiella aerogenes. J. Bacteriol. 133 : 1329-1338.
- 11.- Pahel G., Rothstein D.M., Magasanik B. 1982. Complex glnA, glnL, glnG operon in Escherichia coli. J. Bacteriol. 150 : 202-213.
- 12.- Wei G.R., Kustu S. 1981. Glutamine auxotrophs with mutations in a nitrogen regulatory gene NtrC that is near GlnA. Mol. Gen. Genet. 183 : 392-399.
- 13.- Ninfa A., Magasanik B. 1986. Covalent modification of the glnG product NR_I by the glnL product NR_{II} regulates transcription

of the glnALG operon in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. **83** : 5909-5913.

14.- deBruijn F.J., Ausubel F.M. 1981. The cloning and transposon Tn5 mutagenesis of the glnA region of Klebsiella pneumoniae identification of glnR a gene involved in the regulation of the nif and hut operons. Mol. Gen. Genet. **183** : 289-297.

15.- Goldie H., Magasanik B. 1982. Effects of glnL and other regulatori loci on the regulation of transcription of glnA-lacZ fusions in Klebsiella aerogenes. J.Bacteriol. **150** : 231-238.

16.- Dixon R. 1984. Tandem promoters determine regulation of the Klebsiella pneumoniae glutamine synthetase (glnA) gene. Nucleid Acids Res. **12**: 7811-7830.

17.- Reitzer L.J., Magasanik B. 1985. Expression of glnA in Escherichia coli is regulated at tandem operons. Proc. Natl. Acad. Sci. **82** : 1979-1983.

18.- Buch M., Miller S., Drummond M., Dixon R. 1986. Upstreams activator of nitrogen fixation genes. Nature **320** : 374-378.

19.- Kustu S., Hirschman J., Burton D., Jelesko J., Meeks J.C. 1984. Covalent modification of bacterial glutamine synthetase : physiological significance. Mol. Gen. Genet. **197** : 309-317.

20.- Wolheuter R.M., Schutt H., Holzer H. 1973. Regulation of glutamine synthesis in vivo in Escherichia coli. In Prusiner S., Stadtman E.R. (eds) The enzymes of glutamine metabolism Acad. Press N.Y. pp 45-64.

21.- Reuveny Z., Foor F., Magasanik B. 1981. Regulation of glutamine synthetase by the regulatory protein PII in Klebsiella aerogenes mutants lacking adenylyltransferase J.Bacteriol **146** : 740-745.

22.- Foor F., Jan Ssen K.N., Magasanik B. 1975. Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72** : 4844-4848.

23.- Foor F., Reuveny Z., 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.

24.- Foor F., Cedergren R.J., Streicher S., Rhee S.G., Magasanik B. 1978. Glutamine synthetase of Klebsiella aerogenes properties of glnD mutants lacking uridylyltransferase. J. Bacteriol. **134** : 562-568.

25.- Castaño I., Bastarrachea F., Covarruvias A. 1988. gltBDF operon of Escherichia coli. J. Bacteriol **170**: 821-827.

27.- Leonardo J.M., Goldberg R.B. 1980. Regulation of nitrogen

metabolism in glutamine auxotrophs of Klebsiella pneumoniae. 142 : 99-110.

28.- Brenchley J.E., Magasanik B. 1974. Mutants of Klebsiella aerogenes lacking glutamate dehydrogenase. J.Bacteriol. 117 : 544-550.

29.- Merrick M.J. 1988. organization and regulation of nitrogen fixation genes in Klebsiella and Azotobacter. In Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds) Gustav Fisher, Stuttgart New York. pp 293-302.

30.- Merrick M. 1983. Nitrogen control of the nif regulon in Klebsiella pneumoniae : involvement of the ntrA genes and analogies between ntrC and nifA. EMBO J. 2: 39-44.

31.- Buchanan-Wollaston V.M.C., Cannon J.L., Beynon , Cannon F.C. 1981. Role of nifA gene product in the regulation of nif expression in Klebsiella pneumoniae. Nature (London) 294: 776-778.

32.- Holtel A., Merrick M. 1988. The role of the glnB gene expression in Klebsiella pneumoniae. In: Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Both, deBruijn, Newton. (eds) Gustav Fisher, Stuttgart. New York. pp 310.

33.- Ronson C.W., Nixon B.T., Ausubel F.M. 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. Cell 49 : 579-581.

34.- Ninfa A.J., Gottlin, Ninfa E., Lupas A.N., Stock A., Magasanik B. 1988. Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5492-5496.

35.- Morett E., Buck M. 1988. Specific binding of the nifA protein of Klebsiella pneumoniae to the nifH upstream activator sequence revealed by in vivo methylation protection experiments. In: Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton. (eds) Gustav Fisher, Stuttgart. New York. pp. 313.

36.- Hill S., Kennedy C., Kavanagh E. 1981. Nitrogen fixation gene (nifL) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae. Nature 290 : 424-426.

37.- Yamamoto M., Droffner M.L. 1985. Mechanisms determining aerobic or anaerobic growth in the facultative anaerobe Salmonella typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2077-2081.

38.- Boddey R.M., Chalk P.M., Victoria R., Matsui E., Dobereiner J. 1983. The use of N¹⁵ isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to

the nutrition of Paspalum notatum cv batatais. Can. J. Microbiol. 29 : 1036-1045.

39.- Bishop P.E., Tarlenski D.M.L., Hetherington D.R. 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in Azotobacter vinelandii. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 7342-7346.

40.- Robason R.L., Eady R.R., Richardson T.H., Miller R.W., Hawkins M., Posgate J.R. 1986. The alternative nitrogenase of Azotobacter chroococcum is a vanadium enzyme. Nature 322 : 388-390.

41.- Chisnell J.R., Premakumar R., Bishop P.E. 1988. Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain of Azotobacter vinelandii. J. Bacteriol 170 : 27-33

42.- Kleiner D. 1975. Ammonium uptake by nitrogen fixing bacteria Azotobacter vinelandii. Arch. microbiol. 104: 163-169.

43.- Drozel J.W., Tubb R.S., Posgate J. 1972. A chemostat study of the effect of fixed nitrogen sources on nitrogen fixation membranes and free aminoacids in Azotobacter chroococuum. J. Gen. Microbiol. 73 : 221-232.

44.- Lepo J.E., Wyss O., Tabita F.R. 1982. Regulation and biochemical characterization of the glutamine synthetase of Azotobacter vinelandii. Biochem. Biophys. Acta. 704 : 414-421.

45.- Rockel D., Hernando J., Vakalopoulou E., Post E., Oelze J. 1983. Localization and activities of nitrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase in Azotobacter vinelandii grown in oxygen controlled continous cultures. Arch. microbiol. 136 : 74-78.

46.- Kleinschmidt T.A., Kleiner D. 1978. The glutamine synthetase from Azotobacter vinelandii purification, characterization, regulation and localization. Eur. J. Biochem. 89 : 51-60.

47.- Toukdarian A., Kennedy Ch. 1986. Regulation of nitrogen metabolism in Azotobacter vinelandii isolation of ntr and glnA genes and construction of Ntr mutants. EMBO J. 5 : 399-407.

48.- Lague F., Santero E., Tortolero M., Medina J.R. 1986. Genetic alteration of glutamine synthetase in Azotobacter vinelandii. Microbios lett. 33 : 29-32.

49.- Joerger R.D., Premakumar R., Bishop P.E. 1986. Tn5-induced mutants of Azotobacter vinelandii affected in nitrogen fixation under Mo-deficient and Mo-sufficient conditions. J. Bacteriol. 168 : 673-682.

50.- Robson R., Woodley P., Jones R. 1986. Second gene (nifH*) coding for a nitrogenase iron protein in Azotobacter chroococcum is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein. EMBO

J. 5: 1159-1163.

51.- Sakhno O.N., Ivanovskii R.N. 1981. The glutamine synthetase - glutamate synthase system in Rhodopseudomonas sphaeroides. Mikrobiologiya 50 : 607-612.

52.- Johanson B.C., Gest H. 1976. Inorganic nitrogen assimilation by the photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas capsulata. J.Bacteriol 12: 683-688

53.- Johanson B.C., Gest H. 1977. Adenylation/deadenylation control of the glutamine synthetase of Rhodopseudomonas capsulata. Eur. J. Biochem. 81 : 365-371.

54.- Hillmer P., Gest H. 1977. H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas capsulata: production and utilization of H₂ by restin cells. J.Bacteriol 129: 732-739.

55.- Scolnik P.A., Virosco J., Haselkorn R. 1983. The wild type gene for glutamine synthetase restores ammonia control of nitrogen fixation to gln- (glnA) mutants of Rhodopseudomonas capsulata. J.Bacteriol 155 : 180-185.

56.- Jones B.L., Monty K.J. 1979. Glutamine as feedback inhibitor of the Rhodopseudomonas sphaeroides nitrogenase system. J.Bacteriol. 139 : 1007-1013.

57.- Autges P., Kanz R.G., Haselkorn R. 1985. Isolation and organization of genes for nitrogen fixation in Rhodopseudomonas capsulata. Mol Gen Genet. 201 : 363-369.

58.- Scolnik P.A., Haselkorn R. 1984. Activation of extracopies of genes coding for nitrogenase in Rhodopseudomonas capsulata. Nature 307 : 289-292.

59.- Masepohi B., Klipp W., Puhler A. 1988. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated nifA/nifB gene region of Rhodobacter capsulatus. In: Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton. (eds) Gustav Fisher, Stuttgart, New York. pp 176.

60.- Patriquin D.G., Dobereiner J., Jain D.K. 1983. Site and process of association between diazotrophs and grasses. Can J. Microbiol. 29 : 900-915.

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

62.- Okon Y. 1985. Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. Trends. Biotechnol. 3 : 223-228.

- 63.- Okon Y., Albrecht S.L., Burris R.H. 1976. Carbon and ammonia metabolism of Spirillum lipoferum. J. Bacteriol. 128 : 592-597.
- 64.- Maulik P., Ghosh S. 1986. NADPH/NADH dependent cold labile glutamate dehydrogenase in Azospirillum brasilense, purification and properties. Eur. J. Biochem. 155 : 595-602.
- 65.- Westby C.A., Enderlin C.S., Steinberg N.A., Joseph C.M., Meeks J.C. 1987. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4$ by Azospirillum brasilense grown under nitrogen limitation and excess. J. Bacteriol. 169: 4211-4214.
- 66.- Bam D., Barberio C., Bozzicalupo M., Favilli F., Gallori E., Polsinelli M. 1980. Isolation and characterization of glutamate synthase mutants of Azospirillum brasilense. J. Gen. Microbiol. 119 : 239-244.
- 67.- Elmerich C., Bozouklian H., Vielle C., Fogher C., Perroud B., Perrin A., Vanderleyden J. 1987. Azospirillum : genetics of nitrogen fixation and interactions with plants. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B317 : 183-192.
- 68.- Bozouklian H., Elmerich C. 1986. Nucleotide sequence of the Azospirillum brasilense Sp7 glutamine synthetase gene. Biochemie 68 : 1181-1187.
- 69.- Elmerich C., Golimand M., Vielle C., Delorne F., Zamaroczy M. 1988. Nitrogen fixation genes of Azospirillum. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds), Gustav Fisher, Stuttgart. New York. pp 327-331.
- 70.- Colonna Romano S., Riccio A., Guida M., Defez M., Lamberti A., Iaccarino M., Arnold W., Priefer U., Puhler A. 1987. Tight linkage of glnA and a putative regulatory gene in Rhizobium leguminosarum. Nucleic Acid Res. 15 : 1951-1964.
- 71.- Quivigen B., Franche C., Lutfalla G., Rice D., Haselkorn R., Elmerich C. 1982. Cloning of a nitrogen fixation (nif) gene cluster of Azospirillum brasilense Biochemie 64 : 495-502.
- 72.- Pedrosa F.O., Yates M.G. 1984. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of Azospirillum brasilense by nifA and ntr (gln) type gene product. FEMS Microbiol. lett. 29 : 95-101.
- 73.- Haselkorn R. 1978. Heterocyst. Ann. Rev. Plant Physiol. 29 : 319-344.
- 74.- Lea P.J., Mifflin B.J. 1975. Glutamine (amide) 2-oxoglutarate aminotransferase in blue green algae. Biochem. Soc. Trans. 3 : 381-384.
- 75.- Rowerll P., Stewart W.D.P., Eiticott S. 1977. Glutamine synthetase and nitrogenase activity in the blue green alga Anabaena

cylindrica New Phytol. 79 : 41-54.

76.- Tumer N.E., Robinson, Haselkorn R. 1983. Different promoters for the Anabaena glutamine synthetase gene during growth utilizing molecular or fixed nitrogen. Nature 306 : 337-342.

77.- Orr J., Haselkorn R. 1982. Regulation of glutamine synthetase activity and synthesis in free living and symbiotic Anabaena spp J.Bacteriol 152: 626-635.

78.- Meeks J., Steinberg N.A., Enderlin C.S., Joseph C.M., Peters G.A. 1987. Azolla-Anabaena relationship. fixation of ^{13}N N_2 . Plant Physiol 84 : 883-886.

79.- Haselkorn R., Golden J.W., Lammers P.J., Mulligan M.E. 1986. Developmental rearrangement of cyanobacterial nitrogen fixation genes. TIG October 255-259

80.- Torrey J.G. 1985. The site of nitrogenase in Frankia in free-living and in symbiosis. In H.J.Evans, P.J. Bottomley, W.E.Newton (ed) Nitrogen fixation research progress. 6th international symposium on nitrogen fixation. Corvallis USA.

81.- Benson D.R., Noridge N.A., Taylor D.A. 1988. Enzymes of ammonia assimilation in hyphae and vesicles of Frankia sp strain Cp11. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds). Gustav Fischer, Stuttgart, New York. pp.693.

82.- Normand P., Simonet P., Bardin R. 1988. Characterization of nif-hybridizing fragments and sequence determination of the nifH gene in Frankia. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds). Gustav Fischer, Stuttgart, New York. pp.696.

83.- Vance C.P.1983.Rhizobium infection and nodulation : a beneficial plant disease? Ann.Rev.microbiol 37 : 399-424

84.- deBruijn F.J., Pawlowski K., Ratet P., Hilgert U., Wong C.H., Schneider M., Meyer H., Schell J. 1988. Molecular genetics of nitrogen fixation by Azorhizobium caulinodans ORS571, the diazotrophic stem nodulating symbiont of Sesbania rostrata In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds). Gustav Fisher, Stuttgart. New York. pp 351-355.

85.- Darrow R. 1980. Role of glutamine synthetase in nitrogen fixation. In J.Mora, R.Palacios (ed)Glutamine synthetase : metabolism, enzymology and regulation. Acad. Press, New York.

86.- Donald R. G., Ludwig R. 1984. Rhizobium sp strain ORS571 ammonium assimilation and nitrogen fixation. J. Bacteriol158 : 1144-1151.

87.- Kondorosi A., Svab Z., Kiss G.B., Dixon R. 1977. Ammonium

Assimilation and nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. Mol. Gen. Genet. 151 : 221-226.

88.- Ludwig R. 1978. Control of ammonium assimilation in Rhizobium sp 32HI. J. Bacteriol 135 : 114-123.

89.- O'Gara F., Manian S., Meade J. 1984. Isolation of a asm-mutant of Rhizobium japonicum defective in symbiotic nitrogen fixation. FEMS microbiol lett 24 : 241-245.

90.- Osburne M., Signer E. R. 1980. Ammonium assimilation in Rhizobium meliloti J. Bacteriol. 143 : 1234-1240.

91.- Hilgert V., Schell J., de Bruijn F.J. 1987. Isolation and characterization of Tn5 induced NADPH-glutamate synthase GOGAT⁺ mutants of Azorhizobium sesbaniae ORS571 and cloning of the corresponding glt locus. Mol. Gen. Genet. 210 : 195-202.

92.- Sui Sheng T Hua, Laurence D. 1985. Cosmid cloning of DNA from Rhizobium sp WR1001 and identification of the gene coding for glutamate synthase. In Evans H., Bottomley P, Newton W (ed) Nitrogen fixation research progress. 6th International symposium on nitrogen fixation. Corvallis USA.

93.- Darrow R., Knotts R. 1977. Two forms of glutamine synthetase in free living root nodule bacteria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 78: 554-559.

94.- Siva Kumar P., Rao L.N. 1986. Identification and characterization of three forms of glutamine synthetase unique to Rhizobia. Current Microbiol 14 : 113-116.

95.- Rossbach S., Schneider M., Schell J., deBruijn J. 1988. Characterization of different GS genes of the Rhizobaeaceae and their role in plant bacteria interactions and N-assimilation. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation. Bothe, deBruijn, Newton (eds) Gustav Fischer, Stuttgart. New York. pp383.

96.- Moreno S., Meza R., Wild M., Espin G. 1988. A Rhizobium phaseoli sequence coding for glutamine synthetase III activity, cloning and characterization. 4th International Symposium on Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Acapulco, Mexico.

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

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

99.- Carlson T.A., Marting G., Chelm B. 1987. Differential

transcription of the two glutamine synthetases genes of Bradyrhizobium japonicum. J. Bacteriol. 169 :5861-5866.

100.- Pawloski K., Ratet P., Schell J., deBruijn F. 1987. Cloning and characterization of nifA and ntnC genes of the stem nodulating bacterium ORS571 the nitrogen fixing symbiont of Sesbania rostrata : Regulation of nitrogen fixation (nif) genes in the free living versus symbiotic state. Mol. Gen. Genet. 206: 207-219

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

102.- Carlson T.A., Chelm B. 1986. Apparent eukaryotic origin from the bacterium Bradyrhizobium japonicum. Nature 322: 568-570

103.- Fuchs R., Keister D. 1980. Comparative properties of glutamine synthetase I and II in Rhizobium and Agrobacterium spp J. Bacteriol. 144: 641-648

104.- Howitt S., Greshoff P. 1985. Ammonia regulation of glutamine synthetase in Rhizobium sp ANU289. J. Gen Microbiol. 131 : 1733-1740.

105.- Ludwig R. 1980. Physiological roles of glutamine synthetases I and II in ammonium assimilation in Rhizobium sp 32HI J. Bacteriol. 141 : 1209-1216.

106.- Martin G.B., Chapman K.C., Chelm B. 1988. Transcriptional regulation of glnII (glutamine synthetase II) by the Bradyrhizobium japonicum ntrC gene product. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton. (eds). Gustav Fischer, Stuttgart. New York. pp 377.

107.- Ludwig R.A. 1980. Regulation of Rhizobium nitrogen fixation by the unadenylylated glutamine synthetase I system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 5817-5821

108.- Bergerson F.J., Turner G.L. 1978. Activity of nitrogenase and glutamine synthetase in relation to availability of oxygen in continuous cultures of a strain of cowpea Rhizobium sp. Biochem. Biophys. Acta 538 : 406-416.

109.- O'Gara F., Shanmugan K.T. 1976. Regulation of nitrogen fixation by Rhizobium export of fixed N₂ as NH₄. Biochem. Biophys. Acta 437 :313-321.

110.- Ranga Rao V., Darrow R., Keister D. 1978. Effect of oxygen tension on nitrogenase and glutamine synthetases I and II in Rhizobium japonicum 61A76. Biochem. Biophys. Res. Comm. 81 : 224-231.

- 111.- Adams T.H., Chelm B.K. 1988. Effects of oxygen levels on the transcription of *nif* and *gln* genes in *Bradyrhizobium japonicum* J.Gen.microbiol. 134 : 611-618.
- 112.- Rossbach S., Schell J., deBruijn F. 1987. The *ntrC* gene of *Agrobacterium tumefaciens* C58 controls glutamine synthetase GSII activity; growth on nitrate and chromosomal but not Ti-Encoded arginine catabolism pathways. Mol. Gen. Genet. 209: 419-426
- 113.- Ronson C., Nixon T., Albright L., Ausubel F. 1987. *Rhizobium meliloti* *NtrA* (*RpoN*) gene is required for diverse metabolic functions. J. Bacteriol. 169 : 2424-2431.
- 114.- Quinto C., de la Vega H., Flores M., Fernandez L., Ballado L., Soberon G., Palacios R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature 299 : 724-726.
- 115.- Beynon J.L., Williams M.K., Cannon F. 1988. Expression and functional analysis of the *Rhizobium meliloti* *nifA* gene. EMBO J. 7 :7-14.
- 116.- Ditta G., Virts E., Palomares A., Kim C. 1987. The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. J. Bacteriol. 169 : 3217-3223.
- 117.- Kahn D., David M., Batet J., Daveran M.L., Garneavane M., Hertig C., Paques F., Ruo Ya L., Boistard P. 1988. Cascade activation of *nif* genes in *Rhizobium meliloti*. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years after. Bothe, deBruijn, Newton (eds). Gustav Fischer, Stuttgart. New York pp 357-361.
- 118.- Ronson C.W., Lyttleton P., Robertson J. 1981. C₄-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 4284-4288.
- 119.- Gardiol A., Truchet G., Dazzo F. 1987. Requirement of succinate dehydrogenase activity for symbiotic bacteroid differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules. App. Env. Microbiol. 53:1947-1950.
- 120.-Salminen S., Streiter J. 1987. Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacterioids. J. Bacteriol. 169 : 495-499.
- 121.- Kaneshiro T., Kurtzman M. 1982. Glutamate as a differential nitrogen source for the characterization of acetylene reducing *Rhizobium* strains. J. App. Bacteriol. 52 : 201-207.
- 122.- Kahn M., Kraus J., Somerville J. 1985. A model of nutrient exchange in the *Rhizobium* - legume symbiosis. Vith International Nitrogen Fixation Symposium. Corvallis USA.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

123.- Redmond J.W., Batley M., Djordjevic M.A., Innes R.W., Kuempel P.L., Rolfe B.G. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in Rhizobium. Nature 323 : 632-636.

124.- Djordjevic M.A., Redmond J.W., Batley M., Rolfe B.G. 1987. Clovers excrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii. EMBO J. 6 : 1173-1179.

125.- Puler A., Enenkel B., Hillermann A., Kapp D., Keller M., Muller P., Niehaus K., Priefer U.B., Quandt J., Schmidt C. 1988. Rhizobium meliloti and Rhizobium leguminosarum mutants defective in surface polysaccharide synthesis and root nodule development. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds) Gustav Fisher, Stuttgart. New York. pp 423-430.

126.- Glenn A.R., McKay I.A., Arwas R., Dilworth M.J. 1984. Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 130 : 239-245.

127.- Fitzmaurice A.M., O'Gara F. 1988. Involvement of glutamate as carbon source in supporting nitrogen fixation activity in Rhizobium meliloti. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds) Gustav Fisher, Stuttgart. New York. pp.558.

128.- Kouchi H., Fukai K. 1988 Uptake and metabolism of aspartate and glutamate by soybeans nodule bacteroids. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds). Gustav Fisher Stuttgart. New York. pp. 561.

129.- Dusha I., deBruijn F.J., Kondorosi A., Schell J. 1988. The effect of combined nitrogen in nod gene expression in Rhizobium meliloti. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds). Gustav Fischer, Stuttgart. New York. pp 461.

130.- Jin H.N., Glenn A.R., Dilworth M.J. 1988. Metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) by cowpea Rhizobium MN2030. In : Nitrogen Fixation : Hundred Years After. Bothe, deBruijn, Newton (eds). Gustav Fischer, Stuttgart. New York. pp. 560.