

2691

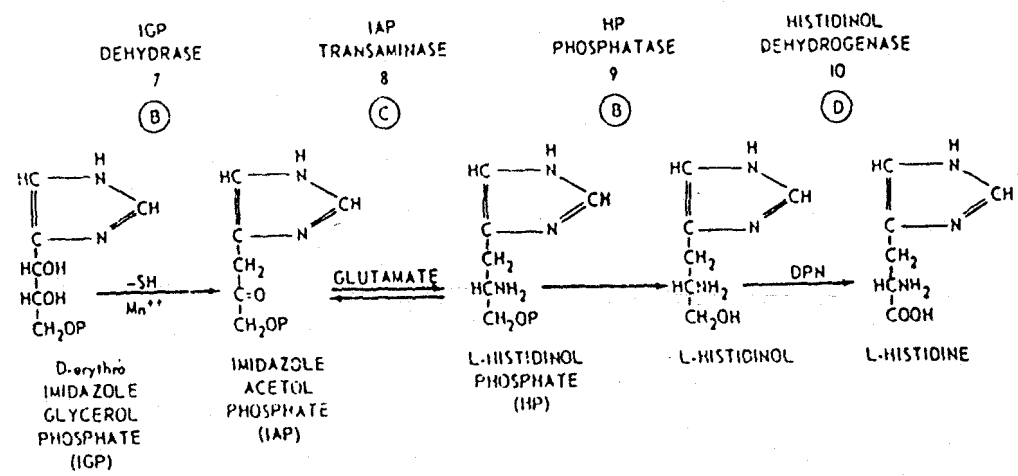
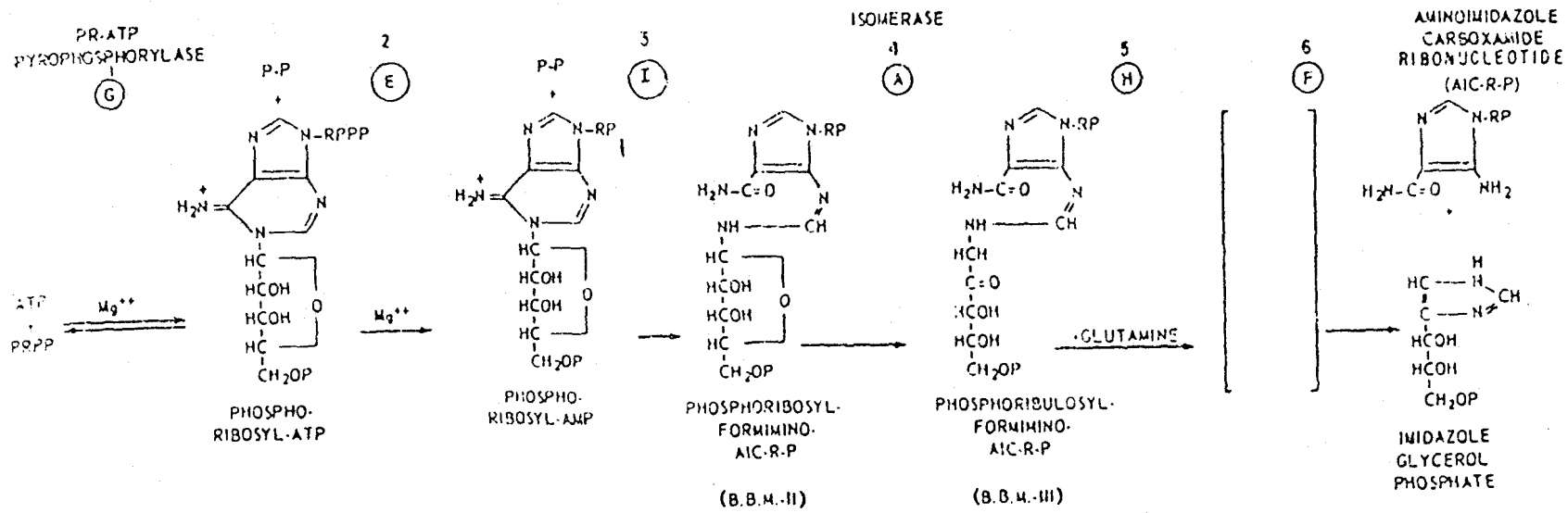
T.99

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

"ESTUDIO DEL OPERON DE LA HISTIDINA EN Rhizobium trifolii."

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA



Ruta biosintética de la histidina en Salmonella typhimurium.

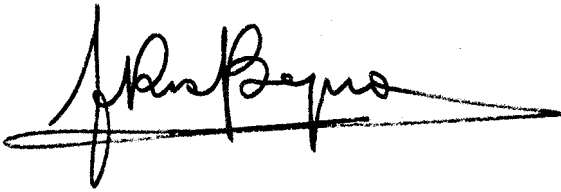
ESTUDIO DEL OPERON DE LA HISTIDINA EN Rhizobium trifolii

por

MERCEDES ANDRES GARCIA

El Ponente

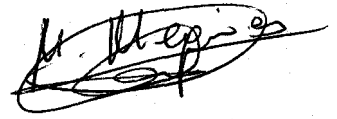
Francisco Ruiz-Berraquero



Catedrático Director del
Departamento de Microbiología
de la Facultad de Farmacia de
la Universidad de Sevilla.

El Director

Manuel Megías Guijo



Profesor Adjunto Numerario
de Microbiología de la
Facultad de Farmacia de la
Universidad de Sevilla.

Trabajo presentado para aspirar al Grado de Licenciado en Farmacia.

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Dr. FRANCISCO RUIZ-BERRAQUERO, Catedrático Director del
Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia
de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que el trabajo titulado "Estudio del operón de la histi-
dina en Rhizobium trifolii", realizado por Dña. Mercedes
Andrés García para optar al grado de licenciado, ha sido
llevado a cabo bajo la dirección del Dr. Manuel Megías
Guijo.

Sevilla, 30 de Septiembre de 1983

Prof. Dr. F. Ruiz-Berraquero

Mi gratitud:

Al Prof. Dr. Ruiz-Berraquero, por poner a mi disposición los medios necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Casadesús, por su valiosa ayuda.

A todos mis compañeros de Departamento, especialmente a Miguel Angel Caviedes por sus consejos y su amistad.

Y, sobre todo, al Dr. Megías Guijo, que ha dirigido esta labor, por su constante estí
mulo, su total dedicación y su enorme capa
cidad de trabajo.

INDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| MATERIALES | 32 |
| 1. NOMENCLATURA GENETICA | 33 |
| 2. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS | 34 |
| 3. PRODUCTOS QUIMICOS | 38 |
| 3.1. <u>Antibióticos</u> | 38 |
| 3.2. <u>Otros productos</u> | 39 |
| 4. TAMPONES | 39 |
| 4.1. <u>Tampón Tris-Maleato</u> | 39 |
| 4.2. <u>Tampón M9</u> | 40 |
| 5. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS | 40 |
| 5.1. <u>Medio Base</u> | 40 |
| 5.2. <u>Medio Definido</u> | 41 |
| 5.2.1. Medio mínimo | 41 |
| 5.2.2. Medio mínimo sin fuente de nitrógeno | 43 |
| 5.3. <u>Medio diferencial de MacCONKEY</u> | 44 |
| 5.4. <u>Medios sólidos</u> | 44 |
| METODOS | 46 |
| 1. CULTIVOS DE LAS BACTERIAS EN MEDIO LIQUIDO | 47 |
| 2. RECUENTO DE BACTERIAS VIVAS | 47 |
| 3. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA | 47 |
| 4. OBTENCION DE MUTANTES His ⁻ POR TRANSPOSICION | 48 |

| | | |
|----------|--|----|
| 5. | AISLAMIENTO DE MUTANTES | 49 |
| 5.1. | <u>Aislamiento de mutantes resistentes a antibióticos</u> | 49 |
| 5.2. | <u>Aislamiento, purificación y caracterización de mutantes His⁻</u> | 49 |
| 5.2.1. | Aislamiento y purificación de mutantes His ⁻ | 49 |
| 5.2.2. | Caracterización de mutantes His ⁻ | 50 |
| 5.2.3. | Identificación de <u>hisD</u> , <u>hisG</u> e <u>hisE</u> | 50 |
| 5.2.4. | Identificación de mutantes en las permeasas de la histidina | 52 |
| 5.2.5. | Caracterización de mutantes incapaces de utilizar D-histidina como fuente de L-histidina | 53 |
| 5.2.5.1. | En placa | 53 |
| 5.2.5.2. | En tubo | 53 |
| 6. | SELECCION DE MUTANTES His ⁻ POR EL METODO DE LA PENICILINA | 54 |
| 7. | TEST DE REVERSION | 55 |
| 7.1. | <u>Reversión espontánea</u> | 55 |
| 7.2. | <u>Reversión inducida con nitrosoguanidina</u> | 56 |
| 8. | CONJUGACION ININTERRUMPIDA | 56 |
| 8.1. | <u>En filtro</u> | 56 |
| 8.2. | <u>En placa</u> | 57 |
| 8.3. | <u>En medio líquido</u> | 58 |
| 9. | OBTENCION DE ESTIRPES R-primas | 59 |
| 9.1. | <u>Estirpes R' procedentes de mutantes His⁻ obtenidos por transposición</u> | 59 |
| 9.2. | <u>Criterio de selección de las estirpes R'</u> | 59 |
| 9.3. | <u>Confirmación de estirpes R'</u> | 60 |

| | |
|---|-----|
| RESULTADOS Y DISCUSION | 61 |
| 1. AISLAMIENTO DE MUTANTES AUXOTROFOS His ⁻ | 62 |
| 2. IDENTIFICACION DE GENES <u>hisD</u> | 65 |
| 3. ESTUDIO DE LOS MUTANTES CON FENOTIPO HIS/GLN ⁻ | 69 |
| 4. RELACION HISTIDINA-GLUTAMINA EN LA BIOSINTESIS DE HISTIDI- NA | 72 |
| 5. AISLAMIENTO DE MUTANTES EN EL GEN <u>hisGE</u> | 77 |
| 6. AISLAMIENTO Y ALGUNAS PROPIEDADES DE MUTANTES EN LA UTILI- ZACION DE D-HISTIDINA | 81 |
| 7. CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES EN MEDIO MINIMO CON ARGININA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO | 102 |
| 8. AISLAMIENTO DE R-primas PARA ESTUDIOS DE COMPLEMENTACION | 103 |
| 9. GRUPOS DE COMPLEMENTACION ENTRE ESTIRPES R-primas Y TODOS LOS MUTANTES His ⁻ OBTENIDOS | 111 |
| RESUMEN Y CONCLUSIONES | 113 |
| BIBLIOGRAFIA | 116 |

INTRODUCCION

En los últimos años se ha dado una gran importancia al proceso de la fijación biológica del nitrógeno, ya que la producción de fertilizantes nitrogenados por vía química es un proceso que requiere una gran cantidad de energía. De las bacterias fijadoras de nitrógeno, Rhizobium se puede considerar el género más importante puesto que en su íntima asociación con las leguminosas obtiene una gran cantidad de energía para el proceso en forma de fotosintato. El hecho de que entre las leguminosas noduladas por Rhizobium se encuentren algunas que tienen una importancia fundamental en el proceso de la alimentación mundial enfatiza aún más la importancia de este grupo de bacterias.

Este aumento del interés en la fijación biológica del nitrógeno ha coincidido con el desarrollo de métodos para el análisis genético de esta bacteria, por lo cual no es sorprendente que la genética de Rhizobium se haya desarrollado rápidamente.

Los estudios genéticos en el género Rhizobium comenzaron hace unos veinte años, y los primeros trabajos en este campo se dirigieron a la obtención de mutantes que se pudieran utilizar para demostrar la posible transferencia de material cromosómico desde una estirpe de Rhizobium a otra.

La necesidad de conocer el mapa genético de Rhizobium para localizar los genes implicados en los procesos de nodulación y fijación hizo que se continuasen buscando mutantes que diesen la

de la histidina en otros géneros bacterianos.

En los distintos y numerosos estudios genéticos efectuados en especies de Rhizobium para la obtención de mutantes se han utilizado gran variedad de agentes mutagénicos como: radiaciones U.V. (JOHNSTON et al, 1979; LORKIEWICZ et al, 1971; MEGIAS et al, 1981; NOEL et al, 1982; OSBURNE, 1982; RUSSEL & JONES, 1973; SHAH et al, 1983; WALTON & MOSELEY, 1981a, 1981b; ZAJAC et al, 1975); radiactividad (ROY & MISHRA, 1976; WALTON & MOSELEY, 1981a); altas temperaturas (BANFALVI et al, 1981; ZURKOWSKI, 1982; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978b, 1979); agentes oxidantes como el ácido nitroso (BERINGER, 1974; HEUMANN, 1979; JOHNSTON & BERINGER, 1975; PAIN, 1979; WALTON & MOSELEY, 1981a); agentes alquilantes (KAUSHIK & VEN KATARAMAN, 1972; MEGIAS et al, 1981; SKOTNICKI et al, 1979; WALTON & MOSELEY, 1981a); agentes metilantes como la nitrosoguanidina (AL-ANI, 1976a, 1976b; AL-BAYATTI & AL-ANI, 1977; ARIAS et al, 1982; BERINGER, 1974; BERINGER et al, 1977; BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; CASADESUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; DENARIE et al, 1975; DOCTOR & MODI, 1976; DUNCAN & FRAENKEL, 1979; ELMOKADEM & KEISTER, 1981; FINAN et al, 1983; FORRAI et al, 1983; GARDIOL et al, 1982; HEUMANN, 1979; JESSBERGER et al, 1974; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1978b; KISS et al, 1979; KISS et al, 1980; KONDOROSI et al, 1974; KONDOROSI et al, 1977; KONDOROSI et al, 1980; KOWALSKI & DENARIE, 1972; KOWALCZUK & LORKIEWICZ, 1977; KUYKENDALL, 1981; LORKIEWICZ et al, 1971; LUDWIG & SIGNER, 1977; MAIER & BRILL, 1976, 1978; MEGIAS et al, 1981;

mayor información posible sobre el ordenamiento genético del cro-
mo-
soma de esta bacteria.

Por su complejidad, la simbiosis Rhizobium-leguminosa es un sistema biológico de difícil acceso, particularmente a nivel molecular. El nódulo fijador de N_2 es producto de la interacción de los genomas implicados y, aunque conocemos algunas manifestaciones de dicha interacción, estamos muy lejos de poder elaborar un modelo global.

Para abordar este sistema biológico se debe recurrir en principio al elemento más sencillo de investigar, el género Rhizobium.

El planteamiento y objetivo inicial de esta Tesis de Licenciatura fué comenzar a ordenar genéticamente las mutaciones que, hasta el momento, se conocen en Rhizobium, estableciendo las relaciones entre ellas y clasificándolas según la genética de Escherichia coli y Salmonella typhimurium (SANDERSON & HARTMAN, 1978; BACHMANN, 1983). Este amplio objetivo debe ser elaborado a largo plazo y como primera piedra de este estudio se eligió el ope-
rón de la histidina.

Esta Introducción se orientará hacia una revisión de todos los mutantes obtenidos hasta el momento en el género Rhizo-
bium, con una u otra finalidad, y a una breve revisión del operón

MISHRA et al, 1975; NOEL et al, 1982; O'GARA & SHANMUGAN, 1977; PHILLIPS et al, 1973; RONSON & PRIMROSE, 1979; SCHERRER & DENARIE, 1971; SCHWINGHAMER, 1967; SHAH et al, 1983; SIK et al, 1980; SKOT-NICKI & ROLFE, 1979; SVAB et al, 1978; TRUCHET & DENARIE; 1973; TRUCHET et al, 1980; WALTON & MOSELEY, 1981a; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1977, 1978a) e incluso últimamente mediante la utilización de transposones (BANFALVI et al, 1981; BREWIN et al, 1980b; BREWIN et al, 1982; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; BUCHANAN-WOLLASTON et al, 1980; DJORDJEVIC et al, 1982; DOWNIE et al, 1983; DUNCAN, 1981; FORRAI et al, 1983; HIRSCH et al, 1982; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1982; KISS et al, 1980; MA et al, 1982; MEADE et al, 1982; O'GARA et al, 1981; ROLFE et al, 1981; SCOTT et al, 1982; SIMON et al, 1981; WALTON & MOSELEY, 1981a) y la inserción de plásmidos como el RP4 (HEUMANN, 1979).

Asímismo se han obtenido mutantes espontáneos (ARIAS et al, 1982; BANFALVI et al, 1983; BERINGER, 1974; BERINGER et al, 1978; BREWIN et al, 1980a; BREWIN et al, 1982; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; CARLSON & LEE, 1983; CASADESUS & OLIVARES, 1979; COLE & ELKAN, 1979; DENARIE et al, 1975; ELMERICH et al, 1982; GLENN & BREWIN, 1981; HAUGLAND et al, 1983; HIRSCH et al, 1982; HEUMANN, 1979; JOHNSTON & BERINGER, 1975; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1978b; JORDAN et al, 1969; KOWALSKI, 1971; KUYKENDALL, 1981; KUYKENDALL & ELKAN, 1976; LAW et al, 1982; LEVIN & MONTGOMERY, 1974; LORKIEWICZ & MELKE, 1970; LORKIEWICZ & RUSSA, 1971; MacKENZIE & JORDAN, 1972, 1974; MAIER & MUTAFTSCHIEV, 1982; MAIER et al,

1978; MATERON & HAGEDORN, 1982; MEADE et al, 1982; MEGIAS et al, 1981; MEGIAS et al, 1982; NELSON & SALMINEN, 1982; O'GARA & SHANMUGAN, 1977; PAIN, 1979; PANKHURST, 1974; PANKHURST & CRAIG, 1979; PANKHURST et al, 1982; RALEIGH & SIGNER, 1982; ROLFE & GRESSHOFF, 1980; SANDERS et al, 1978; SANDERS et al, 1981; SCHWINGHAMER, 1964, 1967, 1968; SCHWINGHAMER & DUDMAN, 1973; SCOTT & RONSON, 1982; SCOTTI et al, 1982; SIK et al, 1980; SKOTNICKI & ROLFE, 1979; SKOTNICKI et al, 1979; STANIEWSKI et al, 1973; STANLEY & DUNICAN, 1979; ZELAZNA-KOWALSKA, 1977; ZELAZNA-KOWALSKA & LORKIEWICZ, 1971; ZELAZNA-KOWALSKA & KOWALSKI, 1978; ZELAZNA-KOWALSKA et al, 1974) y espontáneos por filtración (NAPOLI & ALBERSHEIM, 1980; SANDERS et al, 1978).

Todos estos tratamientos realizados en el género Rhizobium se han enfocado a la búsqueda de nuevos mutantes que permitan esclarecer algún aspecto sobre los genes del cromosoma bacteriano que intervienen en la simbiosis, tales como: genes de la nodulación (Nod), genes de la fijación (Fix) y los genes del establecimiento de la interacción Rhizobium-leguminosa (genes de la producción de polisacárido inductor de poligalacturonasa, genes de la transformación de triptófano en ácido indolacético, etc...).

Un estudio bibliográfico detallado de las mutaciones que se conocen hasta el momento en el género Rhizobium se expone en las siguientes páginas.

Se comienza revisando los genes que confieren resistencia a antibióticos y que son de gran utilidad en Rhizobium dado que se usan como carácter genotípico y fenotípico seleccionable. El género Rhizobium es casi indistinguible taxonómicamente de género Agrobacterium por sus características morfológicas, culturales y fisiológicas. La única diferencia entre estos géneros es la producción por Rhizobium de nódulos fijadores de N_2 en raíces de leguminosas y la producción por el género Agrobacterium de tumores (agallas) no fijadores de N_2 en raíces de plantas dicotiledóneas.

Para poder diferenciar, pues, Rhizobium de Agrobacterium se hace necesaria la realización de un test de nodulación, experimento cuya duración suele oscilar entre las cuatro y doce semanas dependiendo del tipo de Rhizobium utilizado. Dada la complejidad de este test, no se puede emplear de forma rutinaria en comprobaciones genéticas de las estirpes que se están utilizando.

Los distintos autores que trabajan en Rhizobium han resuelto este problema mediante la introducción de un carácter genotípico estable en el cromosoma de la bacteria y que, además, conserve la capacidad de fijación de N_2 de los mismos. Por ello, es muy amplia la bibliografía existente respecto a estirpes de Rhizobium resistentes a antibióticos. También, se han utilizado los mutantes resistentes a antibióticos en estudios de detección de estirpes incapaces de nodular.

Se han obtenido mutantes resistentes a los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico (genes nal) (HAUGLAND et al, 1983; MATERON & HAGEDORN, 1982); ampicilina (genes amp) (SHAH et al, 1983); D-cicloserina (genes cyc) (PANKHURST, 1974; PANKHURST & CRAIG, 1979); cloramfenicol (genes clo) (KISS et al, 1980; MATERON & HAGEDORN, 1982; SIK et al, 1980); eritromicina (genes ery) (MATERON & HAGEDORN, 1982); espectinomicina (genes spc) (BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; LAW et al, 1982; MATERON & HAGEDORN, 1982; MEADE et al, 1982; ROLFE & GRESSHOFF, 1980; SCHWINGHAMER & DUDMAN, 1973; SKOTNICKI & ROLFE, 1979; SKOTNICKI et al, 1979); estreptomicina (genes str) (AL-BAYATTI & AL-ANI, 1977; ARIAS et al, 1982; BERINGER, 1974; BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; BUCHANAN-WOLLASTON et al, 1980; CASADESUS & OLIVARES, 1979; CAVIEDES et al, 1982; DJORDJEVIC et al, 1982; DUNCAN, 1981; FINAN et al, 1981; FORRAI et al, 1983; HIRSCH et al, 1982; JESSBERGER et al, 1974; JOHNSTON & BERINGER, 1975; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1978b; JOHNSTON et al, 1982; JULLIOT & BOISTARD, 1979; KAUSHIK & VENKATARAMAN, 1972; KISS et al, 1979; KISS et al, 1980; KONDOROSI et al, 1980; KOWALSKI, 1971; KOWALCZUK & LORKIEWICZ, 1977; LAW et al, 1982; LEPO et al, 1981; MA et al, 1982; MEADE et al, 1982; MEGIAS et al, 1982; MISHRA et al, 1975; RALEIGH & SIGNER, 1982; SANDERS et al, 1981; SCOTT & RONSON, 1982; SCOTTI et al, 1982; SHAH et al, 1983; SIK et al, 1980; STANLEY & DUNICAN, 1979; ZELAZNA-KOWALSKA, 1977; ZELAZNA-KOWALSKA & LORKIEWICZ, 1971; ZELAZNA-KOWALSKA & KOWALSKI, 1978; ZELAZNA-KOWALSKA et al, 1974); garamicina (genes gar) (AL-BAYATTI & AL-ANI, 1977; KISS et al, 1979);

kanamicina (genes kan) (BREWIN et al, 1982; FINAN et al, 1983; JESSBERGER et al, 1974; LEPO et al, 1981; MAIER & MUTAFTSHIEV, 1982; MATERON & HAGEDORN, 1982; ROLFE & GRESSHOFF, 1980; SCOTT & RONSON, 1982; SHAH et al, 1983); neomicina (genes neo) (PANKHURST, 1974; ROLFE & GRESSHOFF, 1980; SKOTNICKI & ROLFE, 1979); novobiocina (genes nov) (MEADE & SIGNER, 1977); rifampicina (genes rif) (AL-BAYATTI & AL-ANI, 1977; BERINGER & HOPWOOD, 1976; BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; CASADESUS & OLIVARES, 1979; DJORDJEVIC et al, 1982; FORRAI et al, 1983; JOHNSTON & BERINGER, 1975; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1982; KISS et al, 1980; KONDOROSI et al, 1982; MAIER & MUTAFTSHIEV, 1982; MATERON & HAGEDORN, 1982; MEADE & SIGNER, 1977; MEADE et al, 1982; MEGIAS et al, 1982; PANKHURST et al, 1982; RALEIGH & SIGNER, 1982; ROLFE & GRESSHOFF, 1980; SANDERS et al, 1981; SCOTT & RONSON, 1982; SHAH et al, 1983; SIK et al, 1980; WALTON & MOSELEY, 1981); trimetoprim (genes tri) (O'GARA et al, 1981); tuberactinomicina (genes tum) (MackENZIE & JORDAN, 1974) y viomicina (genes vio) (MackENZIE & JORDAN, 1974; PANKHURST, 1974; SCHWINGHAMER, 1964).

Los mutantes auxótrofos de aminoácidos y bases y los mutantes que requieren vitaminas han sido estudiados ampliamente, puesto que dan gran información sobre la constitución del genoma de Rhizobium y porque existe una estrecha relación, en algunos casos, entre estos mutantes y las características simbióticas tales como la nodulación y la fijación de N_2 . Una de las estrategias más usadas en la localización de los genes simbióticos en el cromosoma

del género Rhizobium fué la utilización de dichos mutantes; por consiguiente es un apartado de gran interés en este género bacteriano.

Como mutantes que requieren aminoácidos para su crecimiento se han estudiado: mutantes en la biosíntesis de arginina (genes arg) (CASADESUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; MEADE & SIGNER, 1977; MEADE et al, 1982; MEGIAS et al, 1982; O'GARA et al, 1981; PAIN, 1979; SIMON et al, 1981; SVAB et al, 1978; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978); mutantes en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (genes aro) (MEADE & SIGNER, 1977); mutantes en la biosíntesis de asparragina (genes asn) (KAUSHIK & VENKATARAMAN, 1972; O'GARA et al, 1981; SIMON et al, 1981); mutantes en la biosíntesis de cisteína (genes cys) (BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; CASADESUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; FORRAI et al, 1983; HEUMANN, 1968; JOHNSTON et al, 1978; KISS et al, 1979; KISS et al, 1980; KONDOROSI et al, 1974; KONDOROSI et al, 1980; KONDOROSI et al, 1982; LORKIEWICZ et al, 1971; MEADE & SIGNER, 1977; MEADE et al, 1982; PAIN, 1979; SHAH et al, 1983; SIK et al, 1980; SIMON et al, 1981; SVAB et al, 1978; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978); mutantes en la biosíntesis de fenilalanina (genes phe) (BERINGER & HOPWOOD, 1976; BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; CASADESUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; DJORDJEVIC et al, 1982; JOHNSTON & BERINGER, 1975; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1978b; JOHNSTON et al, 1982; KISS et al, 1979; KISS et al, 1980; KONDOROSI et al, 1980; MEADE & SIGNER,

1977; MEGIAS et al, 1982; PAIN, 1979; SIK et al, 1980; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978); mutantes en la biosíntesis de glicina (genes gly) (CASADESUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; JOHNSTON & BERINGER, 1975; KISS et al, 1980; MEADE & SIGNER, 1977; MEADE et al, 1982; SCHERRER & DENARIE, 1971; SIMON et al, 1981); mutantes en la biosíntesis de glutamina (genes gln) (PAIN, 1979); mutantes en la biosíntesis de histidina (genes his) (AL-ANI, 1976; BERINGER, 1974; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; CASADESUS & OLIVARES, 1979; CAVIEDES et al, 1982; HEUMANN, 1968; JESSBERGER et al, 1974; KONDOROSI et al, 1980; KOWALCZUK & LORKIEWICZ, 1977; MEGIAS et al, 1982; PAIN, 1979; RONSON & PRIMROSE, 1979; ROY & MISHRA, 1976; SHAH et al, 1983; SIK et al, 1980; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978); mutantes en la biosíntesis de isoleucina-valina (genes ilv) (AL-ANI, 1976; BERINGER, 1974; CASADESUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; DOCTOR & MODI, 1976; HEUMANN, 1968; MEADE & SIGNER, 1977; PAIN, 1979; SHAH et al, 1983; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978); mutantes en la biosíntesis de leucina (genes leu) (AL-ANI, 1976; BERINGER, 1974; CASADESUS & OLIVARES, 1979; CAVIEDES et al, 1982; DENARIE & BERGERON, 1975; DOCTOR & MODI, 1976; KAUSHIK & VENKATARAMAN, 1972; KISS et al, 1980; KOWALCZUK & LORKIEWICZ, 1977; KOWALSKI & DENARIE, 1972; MA et al, 1982; MEADE & SIGNER, 1977; MEGIAS et al, 1982; PAIN, 1979; ROY & MISHRA, 1976; SIK et al, 1980; SIMON et al, 1981; TRUCHET et al, 1980; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978); mutantes en la biosíntesis de lisina (genes lys) (MEADE & SIGNER, 1977); mutantes en la biosíntesis de metionina (genes met) (BERINGER & HOPWOOD, 1976; BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; CASADE

SUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; HEUMANN, 1968; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1978b; KISS et al, 1979; KONDOROSI et al, 1980; KOWALCZUK & LORKIEWICZ, 1977; LORKIEWICZ et al, 1971; MEADE & SIGNER, 1977; MEADE et al, 1982; MEGIAS et al, 1982; PAIN, 1979; ROY & MISHRA, 1976; SCHERRER & DENARIE, 1971; SIK et al, 1980; SIMON et al, 1981); mutantes en la biosíntesis de ornitina (genes orn) (CASADESUS & OLIVARES, 1979; LORKIEWICZ et al, 1971); mutantes en la biosíntesis de prolina (genes pro) (HEUMANN, 1968; ROY & MISHRA, 1976); mutantes en la biosíntesis de serina (genes ser) (BERINGER & HOPWOOD, 1976; BERINGER et al, 1978; CASADESUS & OLIVARES, 1979; LORKIEWICZ et al, 1971; O'GARA et al, 1981; SIMON et al, 1981); mutantes en la biosíntesis de tirosina (genes tyr) (KISS et al, 1979; MEGIAS et al, 1982; PAIN, 1979; SHAH et al, 1983; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978); mutantes en la biosíntesis de treonina (genes thr) (MEGIAS et al, 1982); y mutantes en la biosíntesis de triptófano (genes trp) (BERINGER, 1974; BERINGER & HOPWOOD, 1976; BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; BUCHANAN-WOLLASTON et al, 1980; DENARIE & BERGERON, 1975; DJORDJEVIC et al, 1982; JOHNSTON & BERINGER, 1975; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1978b; KISS et al, 1979; KONDOROSI et al, 1980; MA et al, 1982; MEADE & SIGNER, 1977; MEADE et al, 1982; PAIN, 1979; RONSON & PRIMROSE, 1979; SIMON et al, 1981; SVAB et al, 1978).

Desde el comienzo de los estudios genéticos en Rhizobium, los mutantes de bases púricas y pirimidínicas tenían una amplia participación en la alteración de la nodulación; por ejemplo,

el caso de los mutantes que requieren adenina para su crecimiento.

Como bases púricas (genes pur) se han estudiado tanto la adenina (genes ade) como la guanina (genes gua) (AL-ANI, 1976; BERINGER, 1974; BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; BUCHANAN-WOLLASTON et al, 1980; CASADESUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; HEUMANN, 1968; JOHNSTON & BERINGER, 1975; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1978b; JOHNSTON et al, 1982; KISS et al, 1979; KONDOROSI et al, 1980; LORKIEWICZ et al, 1971; MEADE & SIGNER, 1977; MEGIAS et al, 1982; O'GARA et al, 1981; PAIN, 1979; PANKHURST & SCHWINGHAMER, 1974; SCHERRER & DENARIE, 1971; SCHWINGHAMER, 1967; SHAH et al, 1983; SIK et al, 1980; SIMON et al, 1981; WALTON & MOSELEY, 1981a).

Como bases pirimidínicas (genes pyr) se han estudiado la timina (genes thy), citosina (genes cit) y uracilo (genes ura) (BERINGER, 1974; BERINGER & HOPWOOD, 1976; BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; BUCHANAN-WOLLASTON et al, 1980; CASADESUS & OLIVARES, 1979; DENARIE & BERGERON, 1975; JOHNSTON & BERINGER, 1975; JOHNSTON et al, 1978a; JOHNSTON et al, 1978b; KISS et al, 1980; KONDOROSI et al, 1980; MA et al, 1982; MEADE & SIGNER, 1977; PAIN, 1979; SCHERRER & DENARIE, 1971; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1977, 1978a).

El género Rhizobium, dependiendo de la especie y es tirpe que utilicemos, puede requerir vitaminas para su crecimiento

normal pero también se han descrito mutantes a vitaminas en aquellas estirpes que no las requerían, tales como: ácido fólico (genes fol) (KAUSHIK & VENKATARAMAN, 1972); ácido nicotínico (genes nic) (KAUSHIK & VENKATARAMAN, 1972); biotina (genes bio) (AL-ANI, 1976; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978); pantotenato sódico (genes pan) (MEADE & SIGNER, 1977); piridoxina (genes pdx) (MEGIAS et al, 1982) y riboflavina (genes rib) (BERINGER et al, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON, 1979; JOHNSTON et al, 1978a; PAIN, 1979; SCHWINGHAMER, 1968).

Otro aspecto interesante y que se ha comenzado a estudiar en los últimos cinco años, es la obtención de mutantes en las rutas metabólicas de carbohidratos en Rhizobium y que pueden estar directa o indirectamente implicados en el establecimiento de la simbiosis.

Se han estudiado mutantes tales como: mutantes deficientes en la actividad glucoquinasa (genes glk) (RONSON & PRIMROSE, 1979); mutantes deficientes en la actividad piruvatocarboxilasa (RONSON & PRIMROSE, 1979); mutantes deficientes en la ruta Entner Doudoroff (RONSON & PRIMROSE, 1979); mutantes deficientes en el consumo de fructosa (RONSON & PRIMROSE, 1979); mutantes deficientes en la utilización de gluconato (O'GARA et al, 1981); mutantes deficientes en la actividad fosfoglucoisomerasa (genes pgi) (ARIAS et al, 1979; ARIAS et al, 1982); mutantes deficientes en la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa (genes kgd) (DUNCAN & FRAENKEL, 1979); mutantes incapaces de utilizar fructosa (DUNCAN, 1981), sor

bitol (DUNCAN, 1981), manitol (DUNCAN, 1981), ribosa (DUNCAN, 1981), xilosa (DUNCAN, 1981; SHAH et al, 1983), arabinosa (DUNCAN, 1981; SHAH et al, 1983), D-manosa (ARIAS et al, 1982) e hipoxantina (KISS et al, 1979); mutantes resistentes al succinato (GARDIOL et al, 1982; GLENN & BREWIN, 1981; SKOTNICKI & ROLFE, 1979) y mutantes en el sistema de transporte de los ácidos C₄-dicarboxílicos (FINAN et al, 1983; RONSON et al, 1981).

Otros mutantes que, igualmente, se han utilizado sobre todo en la construcción de mapas genéticos y en la obtención de un carácter fácilmente seleccionable para experimentos de transferencia genética, son los resistentes a antimetabolitos, tales como: azida sódica (genes azi) (AL-ANI, 1976; KOWALCZUK & LORKIEWICZ, 1977; SIK et al, 1980); canavanina (genes can) (MEGIAS et al, 1982); 5-fluorouracilo (genes fur) (FORRAI et al, 1983; KONDOROSI et al, 1980; KONDOROSI et al, 1982; MEADE & SIGNER, 1977; SCOTT & RONSON, 1982); D-histidina (genes dhu) (PANKHURST, 1974; SCHWINGHAMER, 1968); D-alanina, DL-azatriptófano, DL-fluorotriptófano, D-leucina, D-metionina, L-norleucina y DL-norvalina (PANKHURST, 1974).

También se han descrito mutantes resistentes a bacteriófagos (ATKINS & HAYES, 1982; ZAJAC et al, 1975) y mutantes capaces de utilizar nitrato (genes nar) (KISS et al, 1979; KONDOROSI et al, 1980) utilizados en distintos estudios genéticos.

Por último, los mutantes más importantes en el género

Rhizobium son, evidentemente, aquellos que afectan a los genes responsables de las características simbióticas; hoy en día, la mayoría de los científicos enfocan sus trabajos hacia estos mutantes con la esperanza de elucidar la complejidad de la relación Rhizobium-leguminosa.

En principio, en la bibliografía podemos encontrarnos con una nomenclatura diversificada de los genes de la nodulación. Así, clásicamente, los mutantes de las características simbióticas se clasificaban en dos tipos: Inf^- (no infectivos) y Eff^- (no efectivos). Inf^- son aquellos mutantes que no infectan la leguminosa huésped para formar nódulos mientras que los mutantes Eff^- forman nódulos pero no fijan el N_2 .

Como es difícil demostrar, de forma convincente, que una estirpe es incapaz de infectar la raíz de la leguminosa, muchas estirpes son llamadas Inf^- basándose en que no se ven los nódulos. Por este motivo se han introducido las designaciones fenotípicas Nod y Fix al objeto de clarificar los fenotipos mutantes (BREWIN et al, 1980a). Los mutantes Nod^- son aquellos que no producen nódulos visibles y los Fix^- , aquellos que producen nódulos pero no fijan el N_2 .

Ambos términos para designar los fenotipos mutantes de no-nodulación y no-fijación de N_2 son evidentemente muy amplios y deben existir muchos genes distintos implicados en cada uno de di-

chos fenotipos. Así, en trabajos muy recientes, se han descrito mu tantes dentro del fenotipo Nod^- en distintas etapas de la nodulación, tales como: mutantes defectuosos en la iniciación de la nodulación (genes noi) (ROLFE & GRESSHOFF, 1980); mutantes defectivos en la formación del tubo de infección (genes inb) (BADENOCH-JONES et al, 1982); mutantes que no causan curvatura en el pelo radical (genes hac) (BADENOCH-JONES et al, 1982); mutantes de pérdida de adhesión al pelo radical (genes roa) (BADENOCH-JONES et al, 1982); mutantes defectivos en la persistencia del nódulo (genes nop) (ROLFE & GRESSHOFF, 1980); mutantes defectivos en el desarrollo del bacteroide (genes bad) (ROLFE & GRESSHOFF, 1980) y mutantes defectivos en la producción de polisacárido extracelular (genes exo) (CARLSON & LEE, 1983; LAW et al, 1982; NAPOLI & ALBERSHEIM, 1980; SANDERS et al, 1978; SANDERS et al, 1981).

Igualmente, dentro de los mutantes de fenotipo Fix^- se han descrito: mutantes en la actividad nitrogenasa (genes nif) (ELMERICH et al, 1982; PANKHURST & CRAIG, 1979; PANKHURST et al, 1982); mutantes deficientes en el consumo de H_2 (genes hup) (BREWIN et al, 1982; DEJONG et al, 1982; DREVON et al, 1982; HAUGLAND et al, 1983; KROL et al, 1982; LEPO et al, 1981; MAIER & MUTAFTSHIEV, 1982; NELSON & SALMINEN, 1982; SKOTNICKI et al, 1979) y mutantes deficientes en los citocromos c y aa₃ (ELMOKADEM & KEISTER, 1981).

A continuación se revisa la amplia bibliografía existente sobre los mutantes no nodulantes y no fijadores de N_2 que hasta

el momento se conocen: mutantes deficientes en la producción de nódulos (Nod^-) (AMEMURA & HARADA, 1983; BADENOCH-JONES et al., 1982; BERINGER et al., 1977; BREWIN et al., 1982; BUCHANAN-WOLLASTON et al., 1980; CAVIEDES et al., 1982; DENARIE & BERGERON, 1975; DJORDJEVIC et al., 1982; DOWNIE et al., 1983; HIRSCH et al., 1982; KROL et al., 1982; LORKIEWICZ et al., 1971; MacKENZIE & JORDAN, 1974; MAIER & BRILL, 1976; MAIER et al., 1978; MEADE et al., 1982; NOEL et al., 1982; PAIN, 1979; PANKHURST, 1974; PANKHURST & SCHWINGHAMER, 1974; PATEL et al., 1981; RALEIGH & SIGNER, 1982; ROLFE & GRESSHOFF, 1980; ROLFE et al., 1981; RONSON et al., 1981; SANDERS et al., 1978; SCHWINGHAMER, 1964, 1967, 1968; SCOTT & RONSON, 1982; SCOTT et al., 1982; SIMON et al., 1981; TRUCHET et al., 1980; ZURKOWSKI, 1982; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978b, 1979) y mutantes deficientes en la fijación de N_2 (Fix^-) (BUCHANAN-WOLLASTON et al., 1980; DJORDJEVIC et al., 1982; DOWNIE et al., 1983; DUNCAN, 1981; FORRAI et al., 1983; KONDOROSI et al., 1982; KROL et al., 1982; MA et al., 1982; MAIER & BRILL, 1976; MEADE et al., 1982; NOEL et al., 1982; ROLFE & GRESSHOFF, 1980; SCHERRER & DENARIE, 1971; ZURKOWSKI & LORKIEWICZ, 1978b, 1979).

Después de señalar los mutantes descritos hasta el momento en Rhizobium, cabe plantearse la ordenación y clasificación que se indicaba al principio de la Introducción, por una razón obvia. Si se quiere establecer la situación de los genes responsables de la nodulación en las distintas especies de Rhizobium y se desean comparar los genomas de éstas con respecto a dichos genes, se ha de

conocer perfectamente que los genes comparados responden al mismo defecto genotípico.

Además de la utilidad ya indicada, si se quieren comparar los distintos cromosomas de las diferentes especies de Rhizobium, se han de conocer también íntimamente los genes que se están estudiando.

Hasta el momento se han realizado comparaciones entre distintos mapas genéticos de Rhizobium (KONDOROSI et al, 1980; BERINGER et al, 1982; HOOYKAAS et al, 1982; MEGIAS et al, 1982) basadas en las distancias genéticas obtenidas por la frecuencia de co-transferencia de distintos marcadores genéticos, pero realizándose siempre esta comparación entre mutantes en los que, si bien se conoce el fenotipo alterado, no se conoce en detalle la alteración genotípica, (Figura 1).

Esta última idea nos llevó a comenzar la Tesis de Licenciatura que confiamos pueda representar la apertura de un importante campo en la genética de Rhizobium.

Lo expuesto hasta aquí justifica sobradamente la tarea de ordenar el cajón de sastre que constituyen los mutantes descritos del género Rhizobium; pero sin embargo puede preguntarse el por qué elegimos para comenzar esta labor justamente el operón de la histidina.

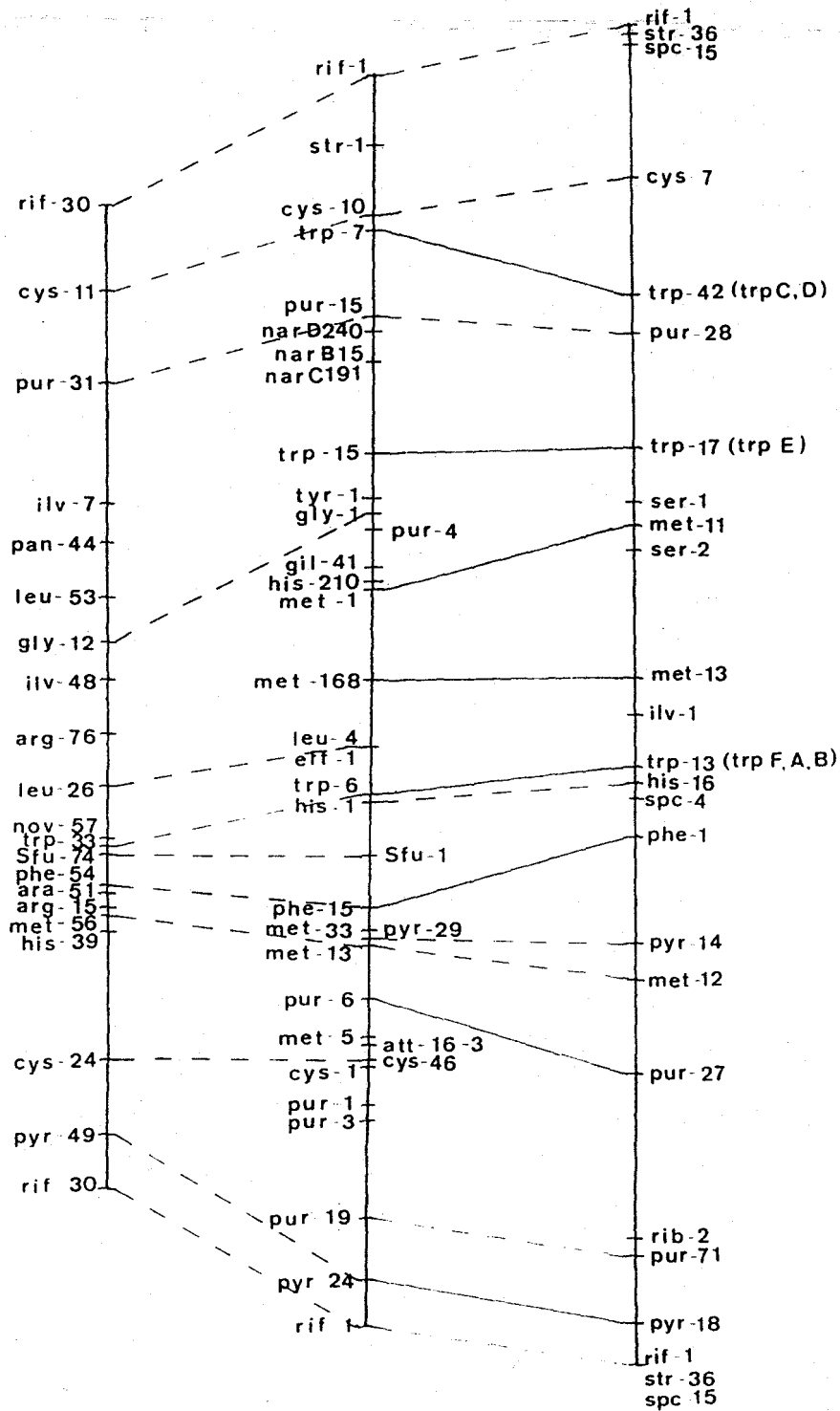


Figura 1. Comparación de mapas de ligamiento de Rhizobium.

Se eligió el operón de la histidina por varios motivos que por sí solos justifican la elección:

(i) La ruta metabólica de la biosíntesis de la histidina es una de las más complejas y atractivas que se presentan en el metabolismo.

(ii) El operón de la histidina es el mejor estudiado en varios géneros bacterianos constituyendo incluso un modelo clásico de operón. En algunas especies bacterianas, todos los genes que lo constituyen se encuentran incluidos dentro de un mismo bloque, característico ya en algunos géneros. Sin embargo, en otros, se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma. La inclusión del género Rhizobium en uno u otro grupo hace interesante la investigación de este aspecto.

(iii) Se conocen muchas mutaciones en la biosíntesis de la histidina en Rhizobium y especialmente en nuestro laboratorio se han estudiado ampliamente en relación con otros aspectos de la asociación Rhizobium-leguminosa.

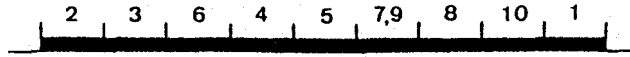
(iiii) Por último, se ha descrito una estrecha relación con la nodulación y producción de polisacárido en Rhizobium trifolii y otras especies, que hace que se puedan situar algunos de estos genes en el cromosoma bacteriano.

La segunda parte de la Introducción se va a dedicar a una breve revisión del operón de la histidina en distintos géneros bacterianos, dedicando especial interés a las especies Salmonella typhimurium y Escherichia coli.

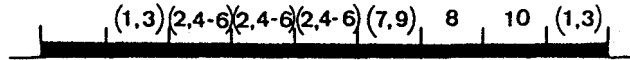
La genética y la bioquímica de la biosíntesis de la histidina se ha estudiado en una variedad de organismos tanto eucariotas como procariotas. Dentro de los organismos eucariotas se incluyen Neurospora crassa (AHMED et al, 1964; CATCHESIDE, 1965), Saccharomyces cerevisiae (FINK, 1964, 1966) y Aspergillus nidulans (BERLYN, 1967). Los genes de la biosíntesis de la histidina en estos organismos presentan solamente tres pasos comunes (pasos 3, 2 y 10 de la ruta).

En organismos procariotas también se presenta diversidad en la disposición de sus genes. En Pseudomonas aeruginosa los genes de la histidina están aparentemente localizados en cinco grupos de complementación distintos (MEE & LEE, 1967); Streptomyces coelicolor (RUSSI et al, 1966) tiene cinco genes de la histidina localizados en un grupo y otros tres genes en lugares diferentes. Bacillus subtilis (CHAPMAN & NESTER, 1969) tiene los genes de la histidina localizados en, al menos, tres regiones del cromosoma desligadas, y, en dos de estas regiones, los genes de la histidina están localizados en grupos. Micrococcus luteus (KANE-FALCE & KLOOS, 1975) presenta al menos cuatro grupos de genes en distintos lugares del cromosoma. En Salmonella typhimurium (AMES & HARTMAN,

Salmonella typhimurium y *Escherichia coli*



Staphylococcus aureus



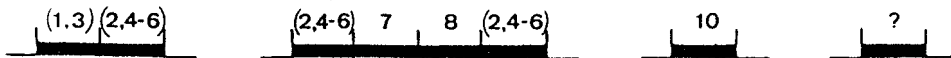
Bacillus subtilis



Streptomyces coelicolor



Micrococcus luteus



Pseudomonas aeruginosa



Figura 2. Grupos de ligamiento de los genes de la histidina en varias bacterias. Los genes se designan mediante el número correspondiente al paso que controlan en la ruta biosintética. El paréntesis indica que la designación exacta del gen es desconocida.

1963; LOPER et al, 1964), Escherichia coli (GARRICK-SILVERSMITH & HARTMAN, 1970) y Staphylococcus aureus (KLOOS & PATTEE, 1965a, 1965b) los genes de la histidina parecen estar ordenados en un solo grupo, constituyendo un operón, (Figura 2).

La ruta biosintética de la histidina se conoció mediante la utilización de mutantes, fundamentalmente, del género Salmonella. En la Figura 3, se muestra la ruta biosintética de la formación de histidina que comprende diez pasos enzimáticos que están catalizados por nueve enzimas en Salmonella typhimurium y cuyos nueve genes se encuentran reunidos en un operón.

El análisis genético más detallado del operón de la histidina se realizó en Salmonella typhimurium y como revisiones más importantes podemos citar entre otras a MARTIN et al (1970), BRENNER & AMES (1971) y UMBARGER (1978).

El detallado análisis genético realizado por HARTMAN et al (1971) hizo posible conocer la conducta fisiológica del operón de los genes específicos y también de las interrelaciones con otros sistemas biosintéticos.

Todos los mutantes fueron aislados de la estirpe LT2 de Salmonella typhimurium salvo algunos que se obtuvieron de la estirpe LT7. Estos mutantes se obtuvieron tanto de forma espontánea como inducida por agentes mutagénicos tales como ICR o nitrosogua-

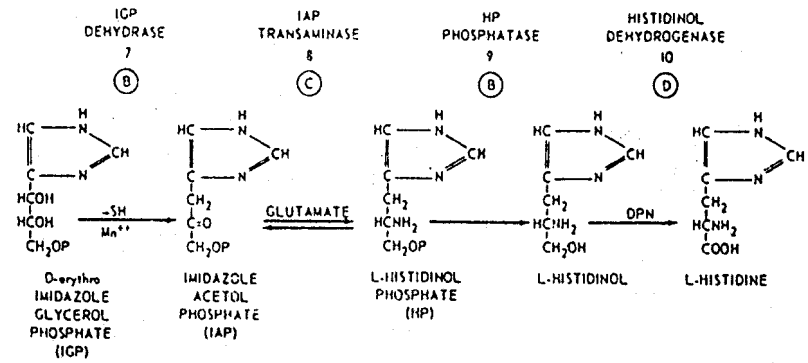
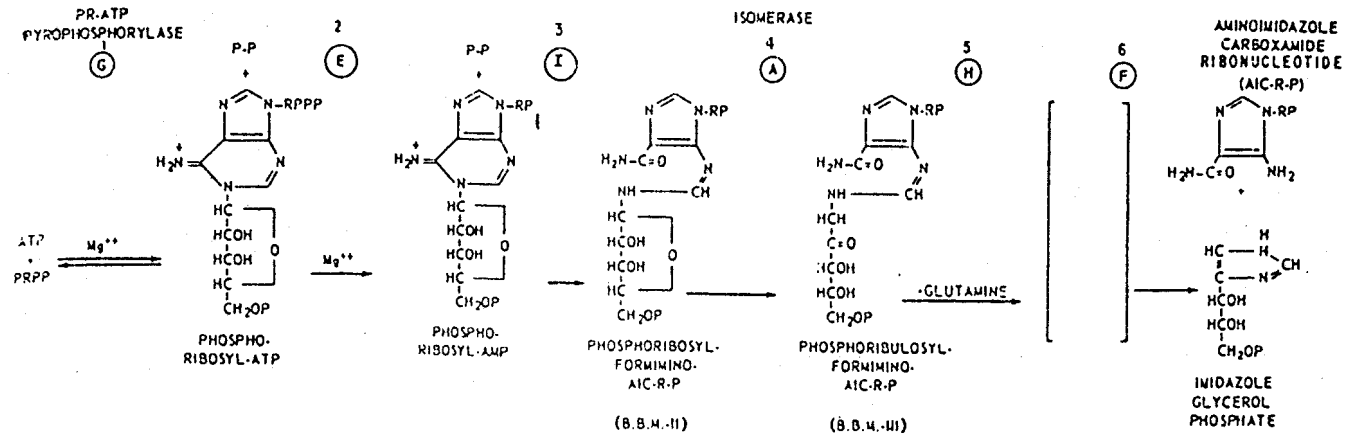


Figura 3. Ruta biosintética de la histidina en Salmonella typhimurium. Los números designan la reacción enzimática y las letras corresponden a los genes. (WHITFIELD, 1971)

nidina (HARTMAN et al, 1960b; LOPER et al, 1964; FINK et al, 1967; OESCHGER & HARTMAN, 1970).

El mapeo genético se realizó mediante transducción con el fago P22 (ZINDER & LEDERBERG, 1952; DEMEREC et al, 1956), cruces con Hfr (NIKAIDO et al, 1967; SANDERSON, 1970) o mediante cruces de F'lac (ANTON, 1968). La clasificación genética fué realizada por test de complementación con F'his de Escherichia coli K-12 (GARRICK-SILVERSMITH & HARTMAN, 1970; GREEB et al, 1971). También se realizó la complementación mediante transducción abortiva con el fago P22 (DEMEREC et al, 1956; HARTMAN et al, 1960a; LOPER et al, 1964).

Del mapeo de las mutaciones obtenidas, HARTMAN describió los genes que codifican los enzimas biosintéticos de la histidina en Salmonella y observó que dichos genes ocupaban posiciones contiguas en el cromosoma (HARTMAN et al, 1960a; HARTMAN et al, 1960b; HOPPE et al, 1979).

En la Figura 4 se muestra la situación general del operón en el cromosoma de Salmonella incluyendo los genes reguladores que se encuentran en lugares distintos al operón de la histidina a excepción del gen hisO (FINK & ROTH, 1968).

AMES & GARRY (1959) observaron que este ordenamiento de los genes puede tener alguna función reguladora. Primero se demostró que la concentración de los enzimas de la histidina en la

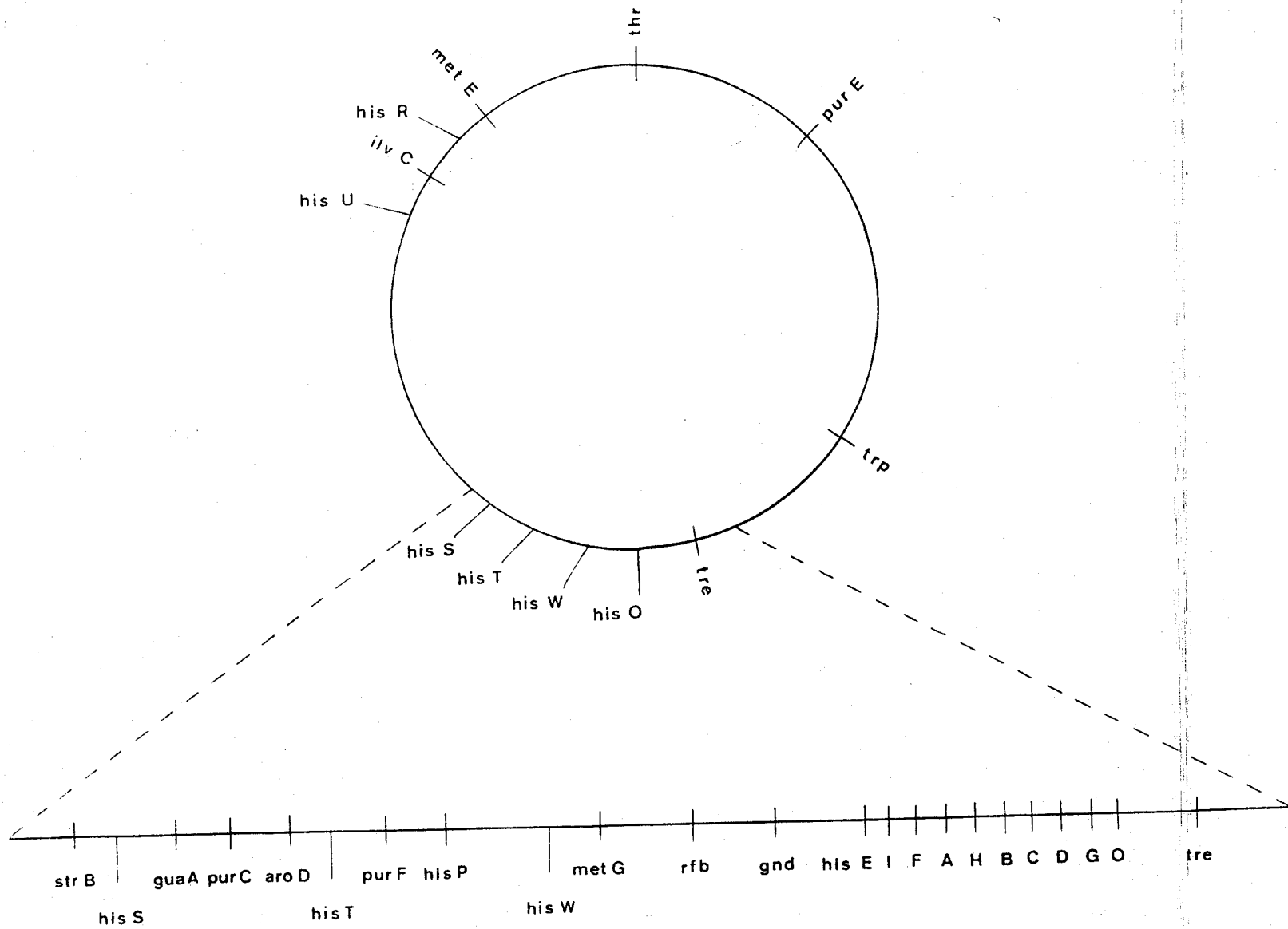


Figura 4. Ordenamiento en el mapa genético de Salmonella de los genes que codifican y regulan la biosíntesis de la histidina.

célula variaba dependiendo de la necesidad que la célula tenía del aminoácido. Así, cuando se suplementaba con histidina un medio mínimo, los niveles enzimáticos bajaban (estaban reprimidos) pero cuando la célula estaba creciendo en un medio pobre en histidina los niveles enzimáticos aumentaban (estaban desreprimidos). Se sugirió que este cambio coordinado de la actividad enzimática podía ser debido al ordenamiento de los genes, poseyendo algún efector tal como la histidina o el histidil-tRNA. Estas observaciones sirvieron a JACOB & MONOD (1961) para postular que la expresión de un grupo de genes, un operón, está controlada por un conmutador llamado operador. Posteriormente, WINKLER et al (1978) han encontrado la existencia en el operón de la histidina, de un promotor y un atenuador al comienzo de la lectura del operón.

Estas indicaciones de JACOB & MONOD y las observaciones realizadas por MARTIN (1963) de que en salmonellas desreprimidas se encontraban ARN mensajeros de alto peso molecular, indican que en la transcripción del operón de la histidina se forma un ARNm policistrónico. Esta hipótesis de la existencia de un ARNm policistrónico fué apoyada por los trabajos de BAGDASARIAN et al (1970). En la actualidad se conoce incluso la longitud del operón de la histidina, que tiene cerca de 10.000 nucleótidos (MARTIN, 1963; RHOADES et al, 1968; BAGDASARIAN et al, 1970).

Actualmente el operón de la histidina se encuentra estudiado minuciosamente y son muy pocos los detalles que quedan por

elucidar en el género Salmonella. Hacer en esta Introducción una revisión exhaustiva de dicho operón nos llevaría a escribir muchas páginas sobre el mismo. Vamos, pues, a mencionar finalmente algunos aspectos de los mecanismos de regulación del operón y de los mutantes reguladores descritos.

MOYED & MAGASANICK (1960) describieron que la histidina es un inhibidor de la fosforribosil-ATP sintetasa, primer enzima de la ruta biosintética, y que ha sido purificado en varios laboratorios (BLASI et al, 1971; WHITFIELD, 1971; PARSONS & KOSHLAND, 1974).

El mayor interés concerniente a la fosforribosil-ATP sintetasa es el papel que juega afectando a la regulación de la expresión de los genes en el operón de la histidina. Esta fué la primera aportación a la regulación de la biosíntesis de la histidina.

Este operón utiliza dos vías diferentes para su regulación: una primera vía, de inhibición feedback (MARTIN, 1963; AMES, 1964; BRENNER et al, 1970; FERNANDEZ et al, 1975; WAINSCOTT & FERRETTI, 1978) que sucede cuando la histidina se transporta al interior de la célula, elevando su concentración intracelular e inhibiendo el producto al primer enzima de la ruta, anteriormente expresado. La segunda vía de regulación del operón de la histidina implica un control de represión donde los enzimas de la ruta biosintética con

trolan la propia concentración intracelular de histidina formada.

El mapeo de estas mutaciones reguladoras ha revelado que se localizan en seis regiones diferentes a lo largo del cromosoma (ROTH & HARTMAN, 1965; ROTH & SANDERSON, 1966; ROTH et al, 1966a; ROTH et al, 1966b; ANTON, 1968; BRENNER & AMES, 1972; BRENNER et al, 1972). Las posiciones de estos genes hisR, hisU, hisW, hisT, hisO e hisS se hallan en la figura anteriormente expuesta. Cinco de ellos no están ligados al operón de la histidina. El gen hisO está localizado al principio del mismo pudiendo ser la región operadora según el modelo de JACOB & MONOD (FINK et al, 1967; FINK & ROTH, 1968; SCOTT et al, 1975).

Las mutaciones en el gen hisS son defectivas en la histidil-tRNA sintetasa (ROTH & AMES, 1966; PARKER & FISHMAN, 1979) observándose posteriormente por WYCHE et al (1974) que la histidil-tRNA sintetasa codificada por el gen hisS juega dos papeles en la regulación del operón de Salmonella typhimurium: uno, en la síntesis de una molécula efectora (histidil-tRNA), y otro, la presencia de la propia proteína comportándose como un efector positivo.

Las mutaciones en la región hisR presentan una reducida cantidad de tRNA de la histidina (SILBERT et al, 1966).

La función del gen hisW está relacionada con el tRNA de la histidina y éste podría bien ser el gen estructural del

trNA^{His} o bien actuar sobre la histidil-trNA sintetasa (DELORENZO et al, 1972; BRENCHLEY & INGRAHAM, 1973; DAVIS & WILLIAMS, 1982).

Los mutantes hisU (BOSSI et al, 1978) tienen algunas propiedades en común con los hisW, lo que podría indicar un mecanismo de actuación similar al anteriormente descrito.

El producto génico del gen hisT está envuelto en la modificación del trNA^{His} (CHANG et al, 1971; LAWTHER & HATFIELD, 1977; ROSENFELD & BRENCHLEY, 1980; PARKER, 1982).

Estos son los genes encargados de la regulación de la represión o desrepresión del operón de la histidina, que han llevado a elaborar una hipótesis de regulación muy interesante que reta a cualquier científico a ratificar en el sistema biológico que se está estudiando.

MATERIALES

I. NOMENCLATURA GENETICA.

Se siguieron las recomendaciones de Demerec et al (1966) para los genes cromosómicos y de Novick et al (1976) para los genes localizados en los plásmidos.

Los genes se designan mediante tres letras (que hacen referencia a la actividad fisiológica que determinan) y un número. Las mutaciones y los alelos se indican mediante el símbolo del gen afectado y el número separado por un guión. En este trabajo se usan las designaciones génicas siguientes:

his, gln, pro, met y ade designan genes en las rutas biosintéticas de los aminoácidos y bases a los que corresponde cada abreviatura. Las mutaciones en estos genes producen auxotrofia para ese aminoácido o base.

dhu designa genes cuyas mutaciones dan lugar a la utilización de D-histidina como única fuente de histidina.

ara, xyl y srl designan genes cuyas mutaciones dan lugar a la no utilización de los carbohidratos arabinosa, xilosa y sorbitol, respectivamente, como única fuente de carbono.

rec y sup designan genes cuyas mutaciones dan lugar a estirpes deficientes en la recombinación y estirpes supresoras de

mutaciones sin sentido, respectivamente.

rif, rps, spc y nal designan genes cuyas mutaciones producen resistencia a rifampicina, estreptomycin, espectinomycin y ácido nalidíxico, respectivamente.

amp, kan, tet y gen designan genes cuyas mutaciones dan lugar a resistencia a ampicilina, kanamicina, tetraciclina y gentamicina, respectivamente.

En esta Tesis de Licenciatura los fenotipos se designan con las mismas o parecidas letras que los genes responsables pero en caracteres redondos y con mayúscula inicial; se usan algunos signos adicionales: + para el alelo silvestre; - para los mutantes; los superíndices R y S indican resistencia y sensibilidad a un inhibidor, respectivamente.

2. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

En la Tabla I se relacionan los plásmidos utilizados en esta Tesis de Licenciatura:

Tabla I. Relación de plásmidos utilizados.

| Nombre | Fenotipo que confiere | Grupo de compatibilidad | Origen |
|--------|-----------------------|-------------------------|------------|
| R68.45 | Ap Tc Kn | PI | J.Beringer |
| pJB3JI | Ap Tc | PI | J.Beringer |
| pJB4JI | Kn Gc | PI | J.Beringer |

En la Tabla II se indican las estirpes utilizadas en la realización de esta Tesis de Licenciatura. Todos los mutantes obtenidos proceden de la estirpe RS4 de Rhizobium trifolii. El origen de cada uno se especifica dando la estirpe de la que procede, el mutágeno utilizado (MNNG= tras tratamiento con nitrosoguanidina) o el cruzamiento del que deriva. En este último caso, constan las estirpes parentales separadas por el signo x para indicar cruzamiento.

En las estirpes que son portadoras de algún plásmido, se indica el nombre de éste entre paréntesis y a continuación el nombre de la estirpe.

Tabla II. Relación de estirpes bacterianas utilizadas.

| Siglas | Genotipo | Origen |
|-------------------------------|-------------------------------|--|
| I. NO ORIGINALES. | | |
| <u>Escherichia coli</u> | | |
| 1830(pJB4JI) | <u>nal pro met</u> | J.Beringer |
| 1830(R68.45) | <u>nal pro met</u> | J.Beringer |
| 1830(pJB3JI) | <u>nal pro met</u> | J.Beringer |
| <u>Salmonella typhimurium</u> | | |
| SV408 | <u>hisG46 araD531 xyl srl</u> | J.Casadesús |
| JL2744 | <u>hisA63 recA1 supA</u> | J.Casadesús |
| II. ORIGINALES. | | |
| <u>Rhizobium trifolii</u> | | |
| RS4 | Silvestre | Aislado de <u>Trifolium repens</u> INIA Sevilla. |
| RS8003 | <u>rif-6</u> | Espontáneo |
| RS8004 | <u>rpsL</u> | Espontáneo |
| RS600 | <u>his-1 rpsL</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8004 |
| RS603 | <u>his-2 rpsL</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8004 |
| RS608 | <u>his/gln-3 rpsL</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8004 |
| RS620 | <u>his/gln-4 rpsL</u> | MNNG |
| RS622 | <u>his/gln-5 rpsL</u> | MNNG |
| RS624 | <u>his/gln-6 rpsL</u> | MNNG |
| RS625 | <u>his/gln-7 rpsL</u> | MNNG |
| RS626 | <u>his/gln-8 rpsL</u> | MNNG |
| RS627 | <u>his/gln-9 rpsL</u> | MNNG |
| RS628 | <u>his/gln-10 rpsL</u> | MNNG |
| RS629 | <u>his/gln-11 rpsL</u> | MNNG |
| RS630 | <u>his/gln-12 rpsL</u> | MNNG |
| RS631 | <u>his/gln-13 rpsL</u> | MNNG |
| RS632 | <u>his/gln-14 rpsL</u> | MNNG |
| RS633 | <u>his/gln-15 rpsL</u> | MNNG |
| RS634 | <u>his/gln-16 rpsL</u> | MNNG |

(...)

TABLA II. Relación de estirpes utilizadas. (continuación)

| Siglas | Genotipo | Origen |
|---------------|----------------------------|-----------------------|
| RS636 | <u>his/gln-17 rpsL</u> | MNNG |
| RS638 | <u>his-18 rpsL</u> | MNNG |
| RS639 | <u>his/gln-19 rpsL</u> | MNNG |
| RS640 | <u>his/gln-20 rpsL</u> | MNNG |
| RS646 | <u>his/gln-21 rpsL</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8004 |
| RS653 | <u>his/gln-22 rpsL</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8004 |
| RS658 | <u>his-23 rpsL</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8004 |
| RS661 | <u>his/gln-24 rif-6</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8003 |
| RS663 | <u>his/gln-25 rpsL</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8004 |
| RS665 | <u>his/gln-26 rpsL</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8004 |
| RS671 | <u>his-27 rif-6</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8003 |
| RS672 | <u>his-28 rif-6</u> Kn | 1830(pJB4JI) x RS8003 |
| RS4638 | <u>his-18 rpsL spc-4</u> | Espontáneo RS638 |
| RS500(pJB3JI) | <u>his-1 rpsL</u> Kn | 1830(pJB3JI) x RS600 |
| RS503(pJB3JI) | <u>his-2 rpsL</u> Kn | 1830(pJB3JI) x RS603 |
| RS561(pJB3JI) | <u>his/gln-24 rif-6</u> Kn | 1830(pJB3JI) x RS661 |
| RS571(pJB3JI) | <u>his-27 rif-6</u> Kn | 1830(pJB3JI) x RS671 |
| RS572(pJB3JI) | <u>his-28 rif-6</u> Kn | 1830(pJB3JI) x RS672 |
| RS573(R68.45) | <u>rif-6</u> | 1830(R68.45) x RS8003 |
| RS574(R68.45) | <u>his-18 rif-6 rpsL</u> | RS573(R68.45) x RS638 |

En la Tabla III se muestran los fenotipos relevantes que presentan algunas de las estirpes R' de Rhizobium trifolii obtenidas como se describe en Métodos, apartado 9.

Tabla III. Características fenotípicas relevantes de las estirpes R' de Rhizobium trifolii obtenidas.

| Estirpe | Fenotipo | Procedencia |
|------------|--|-------------|
| RS600 R'1 | Rif ^r His ⁺ /pJB3JI::Tn5::His ⁻ | RS600 |
| RS603 R'1 | Rif ^r His ⁺ /pJB3JI::Tn5::His ⁻ | RS603 |
| RS672 R'50 | Rps ^r His ⁺ /pJB3JI::Tn5::His ⁻ | RS672 |

3. PRODUCTOS QUIMICOS.

3.1. Antibióticos.

Se utilizaron a las siguientes concentraciones finales en el medio de cultivo:

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Rifampicina..... | 25 mg/l |
| Sulfato de estreptomicina..... | 500 mg/l |
| Sulfato de kanamicina..... | 25 mg/l |
| Tetraciclina..... | 10 mg/l |
| Ampicilina..... | 20 mg/l |
| Espectinomicina..... | 50 mg/l |
| Gentamicina..... | 5 mg/l |
| Penicilina G sódica..... | 1000 U.I. |

Se disolvieron previamente en agua destilada, salvo la rifampicina que fué disuelta en metanol, y se esterilizaron por filtración utilizando membranas Sartorius de 0,45 μ de diámetro de poro.

3.2. Otros productos.

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina)
(Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, U.S.A.)

L-histidina, D-histidina y L-histidinol (Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, U.S.A.)

4. TAMPONES.

4.1. Tampón Tris-Maleato.

Preparado según Gomori (1955). Una solución 0,2 M de Tris-Maleato (solución A) se diluyó hasta 0,05 M mediante adición de una solución de NaOH 0,02 M (solución B) y de agua destilada en las proporciones adecuadas para conseguir pH 5,5.

4.2. Tampón M9.

Se preparó mezclando 100 ml de solución concentrada diez veces de solución M9 con 10 ml de sulfato magnésico (0,01 M), 10 ml de cloruro cálcico (0,01 M) y 880 ml de agua destilada estéril.

La solución M9 consta de:

| | |
|---------------------------|---------|
| K_2HPO_4 | 60 g |
| KH_2PO_4 | 30 g |
| NaCl..... | 5 g |
| NH_4Cl | 10 g |
| Agua destilada c.s.p..... | 1000 ml |

Se disolvió en el orden indicado y se ajustó a pH 7,0.

5. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.

5.1. Medio Base.

El medio base para el aislamiento y conservación en el laboratorio de las estirpes de Rhizobium fué el medio YT descrito por Beringer (1974) que consta de:

| | |
|---------------------------|---------|
| Triptona..... | 5,0 g |
| Extracto de levadura..... | 3,0 g |
| CaCl ₂ | 0,84 g |
| Agua destilada..... | 1000 ml |

El pH se ajustó a 7,0 y el medio se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

5.2. Medio Definido.

5.2.1. Medio mínimo.

El medio mínimo adecuado para poner de manifiesto una auxotrofia para cualquier aminoácido o base fué descrito por Hooykaas et al (1977) y modificado por nosotros. Consta de:

| | |
|---|---------|
| Glucosa..... | 10 g |
| KNO ₃ | 0,6 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,4 g |
| Solución de biotina..... | 1 ml |
| Solución de micronutrientes..... | 0,1 ml |
| Agua destilada..... | 1000 ml |

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente se añadieron al medio, mantenido en sobrefusión a 45°C, los siguientes requerimientos:

Requerimientos nutritivos

| | | |
|--|------|-----|
| Solución de tiamina..... | 1 | ml |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 0,45 | g/l |
| $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,1 | g/l |
| FeCl_3 | 0,02 | g/l |
| CaCl_2 | 0,04 | g/l |

La solución de tiamina se esterilizó previamente por filtración mientras que el resto de las soluciones se esterilizaron al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Las vitaminas se prepararon a las siguientes concentraciones:

| | | |
|--------------|-----|------|
| Biotina..... | 50 | mg/l |
| Tiamina..... | 100 | mg/l |

Solución de micronutrientes

| | | |
|---|---------|----|
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,11 | g |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,0012 | g |
| ZnSO_4 | 0,0015 | g |
| H_3BO_3 | 0,0093 | g |
| Na_2MoO_4 | 0,00018 | g |
| Citrato férrico..... | 1,25 | g |
| Agua destilada..... | 500 | ml |

5.2.2. Medio mínimo sin fuente de nitrógeno.

Este medio, carente de fuente de nitrógeno, fué descrito por Kustu & Ames (1973) y su composición es la siguiente:

| | | |
|----------------------------------|------|----|
| Glucosa..... | 10 | g |
| K_2SO_4 | 1 | g |
| $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 13,5 | g |
| KH_2PO_4 | 4,7 | g |
| Solución de biotina..... | 1 | ml |
| Solución de micronutrientes..... | 0,1 | ml |
| Agua destilada..... | 1000 | ml |

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente se añadieron al medio, mantenido en sobrefusión a 45°C, los requerimientos nutritivos anteriormente citados.

La solución de tiamina se esterilizó por filtración mientras que el resto de las soluciones se esterilizaron al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Las vitaminas se prepararon a las concentraciones anteriormente citadas.

5.3. Medio diferencial de MacCONKEY.

5.3.1. Medio base de MacCONKEY.

Para el cultivo y diferenciación de las colonias de Salmonella se utilizó el siguiente medio:

| | |
|----------------------------------|---------|
| Agar base MacCONKEY (DIFCO)..... | 40 g |
| Agua destilada..... | 1000 ml |

Se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos. El azúcar adicionado fué el manitol a la concentración de 10 g/l, previamente esterilizado por filtración.

5.4 Medios sólidos.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo 12 g/l de agar (OXOID) a los medios líquidos.

Los requerimientos y/o los antibióticos, en soluciones previamente esterilizadas por filtración, se añadieron al medio estéril mantenido en sobrefusión a 45°C para obtener las concentrau

ciones finales siguientes:

| | |
|-------------------|---|
| Aminoácidos..... | 40 mg/l |
| Bases..... | 20 mg/l |
| Vitaminas..... | 10 mg/l |
| Antibióticos..... | Según se indica en Materiales, apartado 3.1. |

METODOS

1. CULTIVOS DE LAS BACTERIAS EN MEDIO LIQUIDO.

Los cultivos líquidos se inocularon a partir de una colonia bacteriana y se incubaron a 28°C con aireación durante 48 horas. A continuación se diluyeron en medio nuevo y se dejaron crecer hasta una concentración aproximada de 2×10^8 células por mililitro, midiendo la densidad óptica a 480 nm con un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic 20".

2. RECUENTO DE BACTERIAS VIVAS.

Después de efectuar las diluciones adecuadas en tampón M9, se tomaron muestras que se esperaba que contuviesen 100-200 u. f.c. (unidad formadora de colonia) y se extendieron en placas con medio YT agar, incubándolas a 28°C durante 48 horas. Para cada determinación se sembraron tres placas y se hizo el promedio de ellas.

3. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA.

La nitrosoguanidina se disolvió en agua destilada (1 mg/l) y se prepararon tubitos que contenían 1 ml. Se guardaron congelados en oscuridad hasta el momento de ser usados y en ningún caso se volvieron a congelar.

Se utilizó la técnica descrita por Megías et al (1981) adaptada a Rhizobium trifolii. El cultivo de bacterias en fase exponencial se lavó dos veces por centrifugación con tampón M9 y se concentró diez veces en tampón Tris-Maleato, pH 5,5. Se añadió la nitrosoguanidina a la concentración final de 500 µg/ml y se incubó a 28°C, durante 30 minutos, en oscuridad y sin aireación.

Después del tratamiento las células se lavaron dos veces con tampón M9.

4. OBTENCION DE MUTANTES HIS⁻ POR TRANSPOSICION.

Se utilizó la técnica descrita por Beringer et al (1974) que consiste en mezclar dos cultivos, uno de células donadoras (Escherichia coli que transporta el transposón Tn5 insertado en el plásmido pJB4JI) y otro de células receptoras (Rhizobium trifolii) que contengan aproximadamente unas 10^8 células/ml. Se mezclan en la proporción de 2:1 y la mezcla se filtra a través de una membrana Sartorius de 0,45 µ de diámetro de poro. La membrana que contiene la mezcla conjugante se deposita en un soporte de agar y se incuba a 28°C durante 16-24 horas. Transcurrido este tiempo se recoge la muestra en 5 ml de tampón M9 y, previa dilución, se siembra en placas con el medio selectivo para los transconjugantes que se especifica en cada caso.

5. AISLAMIENTO DE MUTANTES.

5.1. Aislamiento de mutantes resistentes a antibióticos.

Para la obtención de mutantes resistentes a antibióticos (rifampicina, estreptomocina y espectinomicina) se empleó el medio YT agar. Los medios se adicionaron del producto adecuado y a las concentraciones que se indican en Materiales, apartado 3.1.

En el caso de la obtención de mutantes espontáneos se partió de un cultivo en fase estacionaria de bacterias con una concentración aproximada de 10^9 células/ml. El factor de dilución empleado en cada caso dependió de la frecuencia de aparición de cada uno de los mutantes que se buscaban. Estas frecuencias fueron de 1×10^{-8} para la rifampicina, de 5×10^{-8} para la estreptomocina y de $2,4 \times 10^{-7}$ para la espectinomicina.

5.2. Aislamiento, purificación y caracterización de mutantes His⁻.

5.2.1. Aislamiento y purificación de mutantes His⁻.

Las colonias que habían crecido en medio YT agar tras los distintos tratamientos mutagénicos, se replicaron mediante palillos de diente estériles a placas que contenían medio mínimo.

Las colonias supuestamente auxótrofas se purificaron tres o cuatro veces como garantía de homogeneidad genética.

5.2.2. Caracterización de mutantes His⁻.

La caracterización de los mutantes His⁻ se llevó a cabo de la siguiente forma: cada colonia que crece en el medio YT y no crece en el medio mínimo es, por definición, auxótrofa; ahora bien, para saber si es un mutante His⁻, se prueba en placas conteniendo medio mínimo suplementadas con histidina a la concentración que se especifica en Materiales, apartado 5.

Si un auxótrofo (que no crece en medio mínimo) crece en estos medios, es porque requiere histidina y por tanto será un mutante His⁻.

5.2.3. Identificación de hisD, hisG e hisE.

La identificación de mutantes His⁻ para los genes hisD, hisG e hisE se efectuó por dos métodos diferentes:

I. METODO DEL HISTIDINOL.

II. METODO DE LA GLUTAMINA.

I. METODO DEL HISTIDINOL. La capacidad de los mutantes His⁻ para crecer en presencia de L-histidinol se probó mediante el siguiente método: los mutantes se replicaron mediante palillos de diente estériles, a partir de una colonia aislada, a placas que contenían:

Medio mínimo

Medio mínimo + L-histidinol (1 mM)

Medio mínimo + L-histidinol (1 mM) + adenina (0,5 mM)

Medio mínimo + L-histidina (0,1 mM)

Las placas se incubaron a distintas temperaturas y el crecimiento se observó a los 2, 3 y 5 días.

Este método se realizó también cambiando el L-histidinol por D-histidina.

II. METODO DE LA GLUTAMINA. Este método consistió en inocular los mutantes His⁻ en tubos que contenían:

Medio mínimo + L-histidina (0,3 mM)

Medio mínimo + L-histidina (0,3 mM) + glutamina (1 mM)

Cada tubo se inoculó con 0,1 ml de una suspensión densa de cada mutante y se incubaron a 28°C con agitación en un Lab-Line Orbit Environ Shaker. El crecimiento se observó cada 12 horas midiendo la densidad óptica a 480 nm con un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic 20".

5.2.4. Identificación de mutantes en las permeasas de la histidina.

Para la identificación de estos mutantes se emplearon dos métodos:

I. IDENTIFICACION DE MUTACIONES hisP.

II. IDENTIFICACION DEL COMPORTAMIENTO DE LOS MUTANTES His⁻ AL EFECTO INHIBITORIO DEL TRIPTOFANO.

I. IDENTIFICACION DE MUTACIONES hisP. Este método consistió en sembrar mediante estrías los mutantes His⁻ en placas que contenían medio mínimo sin fuente de nitrógeno (descrito en Materiales, apartado 5.2.2.) suplementado con arginina como única fuente de nitrógeno (10 mM) y con arginina (10 mM) mas histidina (40 mg/l). Se incubaron a 28°C de 3 a 5 días.

II. IDENTIFICACION DEL COMPORTAMIENTO DE LOS MUTANTES His⁻ AL EFECTO INHIBITORIO DEL TRIPTOFANO. La estirpe RS603 se inoculó en tubos que contenían 5 ml de medio mínimo, descrito en Materiales, apartado 5.2.1., suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-triptófano a las siguientes concentraciones: 80 mg/l, 40 mg/l, 20 mg/l, 10 mg/l y 5 mg/l.

Los tubos fueron incubados a 28°C con agitación en un Lab-Line Orbit Environ Shaker. El crecimiento se observó cada 12 horas midiendo la densidad óptica a 480 nm con un espectrofotómetro

Bausch & Lomb "Spectronic 20".

Paralelamente se inoculó un tubo control que contenía solamente medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l).

5.2.5. Caracterización de mutantes incapaces de utilizar D-histidina como fuente de L-histidina.

5.2.5.1. En placa.

Los mutantes His⁻ fueron estriados en placas de medio mínimo suplementadas con D-histidina y L-histidina a distintas concentraciones y en el siguiente orden de siembra:

Medio mínimo + D-histidina (0,01 mM)

Medio mínimo + D-histidina (0,03 mM)

Medio mínimo + D-histidina (0,1 mM)

Medio mínimo + L-histidina (0,03 mM)

Las placas fueron incubadas a 28°C durante 4 días.

5.2.5.2. En tubo.

Los mutantes His⁻ fueron incubados en tubos que conte-

nían 5 ml de medio mínimo suplementado con D-histidina y L-histidina a distintas concentraciones. Para cada mutante se prepararon 4 tubos con:

Medio mínimo + D-histidina (0,01 mM)

Medio mínimo + D-histidina (0,03 mM)

Medio mínimo + D-histidina (0,1 mM)

Medio mínimo + L-histidina (0,03 mM)

Cada tubo se inoculó con 0,1 ml de una suspensión densa de cada mutante y se incubaron a 28°C con agitación en un Lab-Line Orbit Environ Shaker. El crecimiento se observó cada 12 horas midiendo la densidad óptica a 480 nm con un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic 20".

6. SELECCION DE MUTANTES His⁻ POR EL METODO DE LA PENICILINA.

En los casos en que, debido a la baja eficacia del tratamiento mutagénico, no se encontraba un número significativo de auxótrofos, se utilizó el método de selección con penicilina (Lederberg et al, 1952) adaptado a Rhizobium trifolii.

Tras el tratamiento se resuspendió el cultivo en medio líquido YT y se incubó durante un tiempo equivalente a 5 ó 6 generaciones. Con esto se pretendía que los mutantes obtenidos pudiesen multiplicarse y no llevasen enzimas provenientes de sus progenito-

res. Seguidamente el cultivo se lavó, se centrifugó dos veces y se resuspendió en medio mínimo a una concentración no superior a 10^7 células/ml. Este cultivo se incubó durante dos horas con aireación y entonces se añadió penicilina (1000 U.I./ml). Se incubó durante un tiempo equivalente a tres generaciones y seguidamente se lavó dos veces y se resuspendió en medio fresco conteniendo penicilina. Se incubó durante un tiempo equivalente a siete generaciones. Posteriormente se lavó dos veces, se resuspendió y se sembró en cajas que contenían medio YT agar.

7. TEST DE REVERSION.

7.1. Reversión espontánea.

Se inocularon tubos de medio YT líquido con una colonia bacteriana de cada mutante His⁻ y se incubaron a 28°C con aireación dejándolos crecer hasta una concentración aproximada de 1×10^9 células/ml. Los cultivos se centrifugaron y resuspendieron en tampón M9 y, tras efectuar las diluciones adecuadas en dicho tampón, se extendieron en placas de medio mínimo, incubándolas a 28°C durante 4 días. Paralelamente se tomaron alícuotas que se esperaba que con tuviesen 100-200 u.f.c. (unidad formadora de colonia) y se extendieron en placas con medio YT agar, incubándose a 28°C durante 48 horas. Con ello, se pretendió determinar el número de células viables en el cultivo para calcular la frecuencia de reversión espon-

tánea.

7.2. Reversión inducida con nitrosoguanidina.

Este método consiste en sembrar sobre placas de medio mínimo una alícuota de un cultivo con una concentración aproximada de 1×10^9 células/ml, necesaria para la formación de un césped, y depositar en el centro de la placa un pequeño cristal de nitrosoguanidina.

Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días en oscuridad para evitar la descomposición de la nitrosoguanidina por acción de la luz. La aparición de revertientes se observó como colonias situadas a una cierta distancia del cristal de nitrosoguanidina.

8. CONJUGACION ININTERRUMPIDA.

8.1. En filtro.

Se utilizó la técnica descrita por Jacob et al (1976). El método consiste en mezclar dos cultivos, uno de células donadoras y otro de células receptoras, que contengan al menos unas 10^8

células/ml. Se mezclan volúmenes iguales de ambos cultivos. Se toma una alícuota de esta mezcla y se siembra, con la dilución adecuada, en medio selectivo para el donador. Con esto se pretende determinar el número real de células viables del donador, número que se utilizará posteriormente en la estimación de la frecuencia de transferencia del plásmido de que se trate. Seguidamente, la mezcla conjugante se filtra a través de una membrana Sartorius de 0,45 μ de diámetro de poro. La membrana que contiene la mezcla conjugante se coloca en un soporte de agar y se incuba durante 16-24 horas a 28°C. Pasado este tiempo, se recoge la muestra en 5 ml de tampón M9 y, previa dilución, se siembra en placas que contienen el medio selectivo para los transconjugantes que se especifica en cada caso.

8.2. En placa.

Esta técnica consiste en replicar una colonia de la bacteria donadora a una placa de medio YT incubándose a 28°C durante 24 horas, tiempo suficiente para que se forme un pequeño "botón de crecimiento". Transcurrido este tiempo, se mezcla con la bacteria donadora la bacteria receptora poniendo el inóculo con otro pabillo de dientes estéril y mezclándolo con la masa celular anteriormente obtenida, e incubándose otras 24 horas a 28°C. Así, ambas es tirpes, donadora y receptora, crecen juntas y se produce la transferencia de material genético en un espacio reducido.

Transcurridas las 24 horas de crecimiento conjunto, se toma un inóculo del botón de crecimiento y se estría sobre una placa de medio selectivo para obtener los transconjugantes deseados.

8.3. En medio líquido.

Este método consistió en mezclar dos cultivos, uno de células donadoras y otro de células receptoras, en la proporción de 2:1 en un tubo estéril que se mantuvo en estufa durante 12 horas a 28°C y sin agitación.

Después de este tiempo se añadió a dicho tubo una cantidad de medio fresco igual a la cantidad de los cultivos mezclados, adicionado de los antibióticos necesarios para que se favoreciera el crecimiento de los transconjugantes que se deseaban seleccionar. Los cultivos con el medio fresco se incubaron en agitación durante 12 horas a 28°C y, transcurrido este tiempo, se centrifugó la mezcla y se concentró diez veces, sembrándose finalmente en el medio adecuado de los transconjugantes que se desean obtener.

9. OBTENCION DE ESTIRPES R-primas.

9.1. Estirpes R' procedentes de mutantes His⁻ obtenidos por transposición.

Las estirpes mutantes His⁻ realizadas por inserción del transposón Tn5, se cruzaron con una estirpe donadora Escherichia coli 1830(pJB3JI) mediante la técnica de conjugación ininterrumpida en filtro (descrita en Métodos, apartado 8.1.). Se seleccionaron transconjugantes que habían recibido el plásmido pJB3JI y que seguían teniendo incorporado el transposón. Estos transconjugantes se utilizaron como estirpes donadoras y se cruzaron con una estirpe receptora de Rhizobium trifolii, protótrofa y resistente a un antibiótico distinto al que posee la célula donadora, mediante la técnica de conjugación ininterrumpida en placa o en "botón de crecimiento" (descrita en Métodos, apartado 8.2.). Los transconjugantes se estiraron en placas que contenían medio YT agar suplementado con el antibiótico que confiere resistencia a la célula receptora y los que confieren resistencia del transposón Tn5 y el plásmido pJB3JI.

9.2. Criterio de selección de las estirpes R'.

Se eligieron como estirpes R' aquellos transconjugan-

tes cuyo crecimiento en estriás fué continuo en casi la totalidad de la superficie sembrada.

9.3. Confirmación de estirpes R'.

Las estirpes R' procedentes de mutantes His⁻ obtenidos por transposición se caracterizan por llevar insertado junto al factor R un trozo de material cromosómico y el transposón Tn5 que dió origen a la mutación His⁻ por inserción en algún punto del ope
rón de la histidina.

Para comprobar esto, las estirpes R' se utilizaron como estirpes donadoras y se cruzaron con una estirpe receptora RS8003, protótrofa y resistente a un antibiótico distinto al de la célula donadora, mediante la técnica de conjugación ininterrumpida en fil
tro. Se seleccionaron transconjugantes que habían recibido el trans
posón Tn5 y transconjugantes que habían recibido el plásmido pJB3JI, comparándose ambas frecuencias de transferencia, que resul
taron ser muy similares. Esto es indicativo de que el Tn5 va inser
tado junto al pJB3JI y se transfiere a igual frecuencia que éste último, arrastrando parte de los genes de la histidina del mutante original.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. AISLAMIENTO DE MUTANTES AUXOTROFOS His⁻.

El primer objetivo que se abordó fué la búsqueda de mutantes auxótrofos a la histidina. Para ello, se utilizaron dos métodos diferentes de mutagénesis:

En el primero, se utilizó como mutágeno un agente químico, la nitrosoguanidina, cuyo mecanismo de acción es a nivel del punto de replicación y mutagenizando en una zona equivalente a 2 minutos del cromosoma de Escherichia coli. Por consiguiente se trata de mutaciones puntuales, generalmente cambios de bases o pérdidas de unas pocas bases, que afectan a una zona determinada del cromosoma bacteriano en replicación.

El segundo método utilizado para la mutagénesis fué el empleo de elementos transponibles (transposones). Se utilizó el transposón Tn5 que, como se indica en la bibliografía (BERG et al, 1980), produce inserciones al azar en el cromosoma bacteriano dando lugar a una mutación puntual en un solo lugar del cromosoma, afectando así a la actividad de un solo gen.

En la Tabla IV se muestra la frecuencia de aparición de mutantes auxótrofos obtenida por tratamiento con nitrosoguanidina y por transposición con Tn5. De la misma, se deduce que el tratamiento con nitrosoguanidina ha sido muy eficaz produciendo una frecuencia de mutación elevada, 7,1%, pese a la contraselección

con penicilina. El hecho de que de 24 mutantes auxótrofos totales obtenidos, 17 sean His⁻, y de estos 17, 16 sean His/Gln⁻ (fenotipo que indica que son capaces de crecer en presencia de glutamina como único aminoácido), nos sugiere que, a priori, estos mutantes His/Gln⁻ pueden ser hermanos entre sí, debido al tratamiento de contraselección seguido. Posteriormente se mostrará que existen, al menos en algunos casos, diferencias en el comportamiento de estos mutantes.

La utilización del transposón Tn5 como mutágeno ha dado lugar a una frecuencia de transconjugantes similar a la descrita en la bibliografía (MEADE et al, 1982) y la frecuencia de mutación está de acuerdo con los datos obtenidos por otros autores (MEADE et al, 1982) observándose que el 25% de los mutantes auxótrofos totales obtenidos corresponden a mutantes His⁻, y algunos de estos presentan el fenotipo His/Gln⁻.

Todos los mutantes ensayados presentan reversión espontánea comprendida entre 10^{-6} y 10^{-8} . La reversión inducida con nitrosoguanidina aumentó la frecuencia de revertientes en aquellas estirpes conseguidas mediante mutagénesis con el propio agente. Los mutantes obtenidos por transposición no presentaron reversión inducida con la nitrosoguanidina.

Tabla IV. Frecuencia de aparición de mutantes auxotróficos obtenidos por tratamiento con nitrosoguanidina y por transposición.

| Agente mutagénico | Supervivencia y Frecuencia de transconjugantes | Colonias probadas | Auxótrofos totales | Auxótrofos His ⁻ | Frecuencia de mutación |
|-------------------|--|-------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|
| MNNG ^a | 70% | 336 | 24 | | 7,1% |
| | | 336 | | 17 | 5,0% |
| Tn5 ^b | 1 x 10 ⁻⁴ | 11742 | 49 | | 0,4% |
| | | 11742 | | 11 | 0,1% |

(a) Se trató un cultivo con MNNG a la concentración de 500 µg/ml durante 30 minutos.

Posteriormente se seleccionó con penicilina.

(b) Según la técnica descrita en Métodos, apartado 4.

2. IDENTIFICACION DE GENES hisD.

Como ya se indica en la Introducción, la histidinol deshidrogenasa (L-histidinol-nicotinamida adenina dinucleótido oxidoreductasa) es el enzima que cataliza la última etapa en la biosíntesis de la histidina; en Salmonella typhimurium está codificada por el gen hisD (GREEB et al, 1971).

En Salmonella typhimurium este enzima se ha estudiado ampliamente y se ha purificado, comprobándose que posee una estructura molecular de dímero con sus subunidades idénticas (LOPER, 1968; TANEMURA & YOURNO, 1969; YOURNO, 1968).

La actividad enzimática de la histidinol deshidrogenasa es la única que se puede estudiar de forma directa en medio de cultivo por crecimiento o no de los mutantes en presencia de histidinol como única fuente de histidina. El histidinol, aunque es una fuente pobre de histidina, nos va a permitir obtener crecimientos idóneos en medio sólido.

Si nos fijamos en la ruta, una mutación en el gen hisD impide específicamente el paso de L-histidinol a L-histidina. En consecuencia, si adicionamos en el medio mínimo L-histidinol, todos aquellos mutantes que crezcan en dicho medio van a tener alterado un gen que codifique en la ruta un enzima anterior a la histidinol deshidrogenasa. Aquellas estirpes que no crezcan en L-histidinol y

sí lo hagan en L-histidina, tendrán alterado específicamente el gen hisD.

En la Tabla V se muestra el crecimiento de los 28 mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con L-histidina y con L-histidinol a 28°C durante 5 días de incubación. De la misma se deduce que las estirpes RS600, RS603, RS608, RS638 y RS658 no son mutantes en el gen hisD sino que la mutación se encuentra en otro gen que actúa en algún paso anterior en la ruta biosintética.

Las estirpes RS627, RS628, RS640, RS646 y RS653 crecen a los cinco días de incubación en medio mínimo mas L-histidinol, presentando un fenotipo His/Gln⁻. Este hecho nos va a indicar que estos mutantes no son mutantes en el gen hisD.

Al igual que los mutantes anteriormente indicados, las estirpes RS620, RS622, RS624, RS625, RS626, RS629, RS630, RS631, RS632, RS633, RS634, RS636, RS639, RS661, RS663 y RS665, aunque no presentan crecimiento en L-histidinol, al poseer un fenotipo His/Gln⁻ queda descartado que sean mutantes en el gen hisD y sugiere que el periodo de incubación en medio mínimo mas histidinol no fué suficiente para mostrar crecimiento.

Las estirpes RS671 y RS672 presentan un fenotipo limpio como His⁻ y no crecen en presencia de L-histidinol; por consiguiente son mutantes en el gen hisD.

Tabla V. Crecimiento de 28 mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con L-histidinol y L-histidina a 28°C de incubación.

| Estirpes | Medio mínimo | | MM + histidinol (1 mM) | | MM + histidina (0,1 mM) | |
|----------|--------------|-----|---------------------------|-----|----------------------------|-----|
| | (a) | (b) | (a) | (b) | (a) | (b) |
| RS600 | - | - | + | + | + | + |
| RS603 | - | - | + | + | + | + |
| RS608 | - | - | + | + | + | + |
| RS620 | - | - | - | - | + | + |
| RS622 | - | - | - | - | + | + |
| RS624 | - | - | - | - | + | + |
| RS625 | - | - | - | - | + | + |
| RS626 | - | - | - | - | + | + |
| RS627 | - | - | - | + | + | + |
| RS628 | - | - | - | + | + | + |
| RS629 | - | - | - | - | + | + |
| RS630 | - | - | - | - | + | + |
| RS631 | - | - | - | - | + | + |
| RS632 | - | - | - | - | + | + |

(...)

(a) Placas incubadas durante 24 horas.

(b) Placas incubadas durante 120 horas.

(-) No crecimiento.

(+) Crecimiento.

Tabla V. Crecimiento de 28 mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con L-histidinol y L-histidina a 28°C de incubación.

(continuación)

| Estirpes | Medio mínimo | | MM + histidinol (1 mM) | | MM + histidina (0,1 mM) | |
|----------|--------------|-----|---------------------------|-----|----------------------------|-----|
| | (a) | (b) | (a) | (b) | (a) | (b) |
| RS633 | - | - | - | - | + | + |
| RS634 | - | - | - | - | + | + |
| RS636 | - | - | - | - | + | + |
| RS638 | - | - | + | + | + | + |
| RS639 | - | - | - | - | + | + |
| RS640 | - | - | - | + | + | + |
| RS646 | - | - | - | + | + | + |
| RS653 | - | - | - | + | + | + |
| RS658 | - | - | + | + | + | + |
| RS661 | - | - | - | - | + | + |
| RS663 | - | - | - | - | + | + |
| RS665 | - | - | - | - | + | + |
| RS671 | - | - | - | - | + | + |
| RS672 | - | - | - | - | + | + |

(a) Placas incubadas durante 24 horas.

(b) Placas incubadas durante 120 horas.

(-) No crecimiento.

(+) Crecimiento.

3. ESTUDIO DE LOS MUTANTES CON FENOTIPO HIS/GLN⁻.

El fenotipo de estos mutantes, como ya se ha descrito anteriormente, indica que pueden crecer en medio mínimo suplementado con L-histidina como única fuente de histidina o en medio mínimo suplementado con glutamina. Estos mutantes son efectivamente auxótrofos a la histidina aunque sean capaces de crecer en medios donde se encuentre ausente la histidina.

De los 22 mutantes que poseen fenotipo His/Gln⁻, 16 de ellos se han obtenido por mutagénesis con nitrosoguanidina. Estos mutantes se obtuvieron en un solo tratamiento con dicho agente tras contraselección con penicilina, lo que nos sugiere que algunos de ellos sean hermanos entre sí, es decir, procedan de un mismo parental. El resto de los mutantes con fenotipo His/Gln⁻ se obtuvieron mediante transposición con Tn5 en distintos tratamientos.

La gran mayoría de estos mutantes no crecen en presencia de L-histidinol como única fuente de histidina o, si lo hacen, es tras un periodo muy largo de incubación, indicando que su tasa de crecimiento en L-histidinol es muy baja.

Otra propiedad interesante que presentan estos mutantes es la capacidad de crecer en medio mínimo suplementado con glutamina.

La glutamina es necesaria en la ruta biosintética de la histidina en el paso de N-(5'-fosfo-D-1'-ribulosilformimino)-5-amino-1-(5'-fosforribosil)-4-imidazolcarboxamida (BBM III) a un compuesto intermedio inestable. Este paso está catalizado por el producto génico del gen hisH. Por otro lado cabe indicar que la glutamina, como ya se sabe, es un aminoácido esencial para muchas funciones metabólicas de la bacteria, estando por consiguiente a concentraciones intracelulares muy bajas (KUSTU & MCKEREGHAN, 1975).

La hipótesis que puede cuadrar con el fenotipo que presentan estos mutantes es aquella en la cual exista un defecto en el gen hisH que dé lugar a un enzima parcialmente inactivo cuando los niveles intracelulares de glutamina sean bajos, requiriéndose niveles elevados de glutamina para el total funcionamiento del enzima.

Esta hipótesis está apoyada, en parte, por los resultados obtenidos en el medio suplementado con L-histidinol puesto que el histidinol utiliza para penetrar en el interior de la célula el mismo sistema de transporte que la L-histidina, y se sabe que este sistema de transporte está regulado por la concentración intracelular de L-histidina. El hecho de que la tasa de crecimiento en presencia de L-histidinol sea muy baja, puede indicar que el transporte de L-histidinol al interior está controlado por la L-histidina que está sintetizando el enzima parcialmente inactivo producido por

la mutación en el gen hisH.

De los mutantes citados, el RS608 presenta un comportamiento diferente en medio mínimo con L-histidinol. Este mutante crece abundantemente en dicho medio. Por otro lado, todos los mutantes anteriormente citados son incapaces de utilizar la D-histidina como única fuente de L-histidina o, si la utilizan, dan rendimientos de crecimiento muy bajos salvo la estirpe RS608, que es un buen utilizador de D-histidina.

Como se verá posteriormente, la mutación que permite la utilización de D-histidina como única fuente de L-histidina es la mutación dhu, y esta mutación presenta desreprimido el transporte de histidina al interior, siendo incluso cien veces más eficaz el transporte de D-histidina que el de L-histidina. Este hecho nos corrobora que, efectivamente, el histidinol puede penetrar eficazmente en el interior de la célula y dar crecimiento en medio mínimo con L-histidinol.

De lo expuesto anteriormente, se sugiere que todos los mutantes con fenotipo His/Gln⁻ son mutantes en el gen hisH.

4. RELACION HISTIDINA-GLUTAMINA EN LA BIOSINTESIS DE LA HISTIDINA.

Dada la relación existente entre la histidina y la glutamina en la biosíntesis de la histidina, y basándonos en las aportaciones de KUSTU & MCKEREGHAN (1975) sobre las relaciones existentes entre la biosíntesis de histidina y la actividad de la glutamina sintetasa, se creyó oportuno realizar un estudio en medio líquido de la influencia de la glutamina en el crecimiento de mutantes de Rhizobium trifolii. Se esperaba encontrar alguna correlación entre las mutaciones en los genes de la histidina y el gen glnA (responsable del enzima glutamina sintetasa).

En la Tabla VI se estudia la tasa de crecimiento en medio mínimo suplementado o no con glutamina de algunos mutantes y se ha calculado el incremento del rendimiento de crecimiento existente entre los medios mínimos suplementados con L-histidina y los que habían sido suplementados con L-histidina mas glutamina.

En la Tabla VI se observan dos grupos diferentes respecto a su comportamiento en los medios de cultivo. 18 de los 22 mutantes estudiados presentan un incremento tanto en su tasa de crecimiento como en el rendimiento del cultivo. Oscila desde 2 has ta 7 veces en los medios con histidina y glutamina respecto a los medios que solo están suplementados con histidina. Estos mutantes tienen una tasa de división en medios suplementados con histidina mas glutamina que oscila entre las 8 y las 50 horas, mientras que

Tabla VI. Estudio comparativo de la tasa de crecimiento e incremento en valores absolutos y relativos del rendimiento del cultivo en medio mínimo suplementado con histidina y con histidina mas glutamina.

| Estirpes | Tasa de crecimiento (en horas) | | Rendimiento de crecimiento Absoluto | | Relativo |
|----------|-----------------------------------|-------------------|--|-------------------|----------|
| | MM + His | MM + His + Gln | MM + His | MM + His + Gln | Δ |
| RS600 | 100 | 50 | 0,07 | 0,43 | 5 |
| RS603 | 100 | 40 | 0,13 | 0,37 | 3 |
| RS620 | 28 | 8 | 0,12 | 0,28 | 2 |
| RS622 | 100 | 11 | 0,05 | 0,26 | 5 |
| RS624 | 12 | 14 | 0,17 | 0,60 | 5 |
| RS625 | 13 | 8 | 0,22 | 0,71 | 4 |
| RS626 | 100 | 16 | 0,16 | 0,36 | 2 |
| RS629 | 100 | 20 | 0,19 | 0,37 | 2 |
| RS630 | 58 | 26 | 0,15 | 0,44 | 3 |
| RS631 | 22 | 12 | 0,18 | 0,49 | 3 |
| RS632 | 29 | 9 | 0,20 | 0,74 | 4 |

MM + His= Medio mínimo suplementado con histidina. (...)

MM + His + Gln= Medio mínimo suplementado con histidina mas glutamina.

Rendimiento de crecimiento absoluto= Medido como la diferencia de la D.O. a 480 nm a tiempo cero con la máxima D.O. obtenida en el cultivo.

Rendimiento de crecimiento relativo= Medido como el incremento de la D.O. a 480 nm en MM + His + Gln respecto al medio MM + His.

Tabla VI. Estudio comparativo de la tasa de crecimiento e incremento en valores absolutos y relativos del rendimiento del cultivo en medio mínimo suplementado con histidina y con histidina mas glutamina. (continuación)

| Estirpes | Tasa de crecimiento (en horas) | | Rendimiento de crecimiento | | |
|----------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------|
| | MM + His | MM + His + Gln | Absoluto | | Relativo |
| | | | MM + His | MM + His + Gln | Δ |
| RS633 | 100 | 13 | 0,06 | 0,29 | 4 |
| RS634 | 100 | 13 | 0,03 | 0,31 | 7 |
| RS636 | 100 | 20 | 0,04 | 0,27 | 4 |
| RS638 | 100 | 22 | 0,05 | 0,18 | 4 |
| RS640 | 16 | 8 | 0,20 | 0,60 | 3 |
| RS646 | 100 | 13 | 0,14 | 0,32 | 2 |
| RS653 | 34 | 13 | 0,20 | 0,26 | 1 |
| RS663 | 100 | 20 | 0,16 | 0,37 | 2 |
| RS665 | 27 | 13 | 0,33 | 0,32 | 1 |
| RS671 | 30 | 14 | 0,15 | 0,20 | 1 |
| RS672 | 10 | 10 | 0,72 | 0,84 | 1 |

MM + His= Medio mínimo suplementado con histidina.

MM + His + Gln= Medio mínimo suplementado con histidina mas glutamina.

Rendimiento de crecimiento absoluto= Medido como la diferencia de la D.O. a 480 nm a tiempo cero con la máxima D.O. obtenida en el cultivo.

Rendimiento de crecimiento relativo= Medido como el incremento de la D.O. a 480 nm en MM + His + Gln respecto al medio MM + His.

las tasas de división en presencia de histidina son casi todas superiores a las 100 horas.

Por otro lado, existen cuatro mutantes cuya tasa de crecimiento no se vé excesivamente afectada cuando los cultivamos en medio mínimo suplementado con histidina y glutamina. Los rendimientos de cultivo en uno y otro medio son prácticamente iguales. Cabe destacar de estos mutantes el RS672 que posee un rendimiento de crecimiento muy elevado en ambos medios. Este resultado nos hace pensar que los niveles de transporte de L-histidina al interior de la célula son muy elevados, pudiendo estar en este mutante desreprimida la permeasa de la histidina.

Como resultado más significativo de esta Tabla, se puede indicar que la glutamina en Rhizobium trifolii se utiliza como fuente de nitrógeno, lo que supone rendimientos de crecimiento superiores. Según los datos existentes se puede sugerir que no parece haber correlación entre las permeasas de glutamina e histidina.

En la Figura 5 se muestran las curvas de crecimiento de las estirpes RS636 y RS672 incubadas en agitación a 28°C en medio mínimo líquido suplementado con histidina y con histidina mas glutamina.

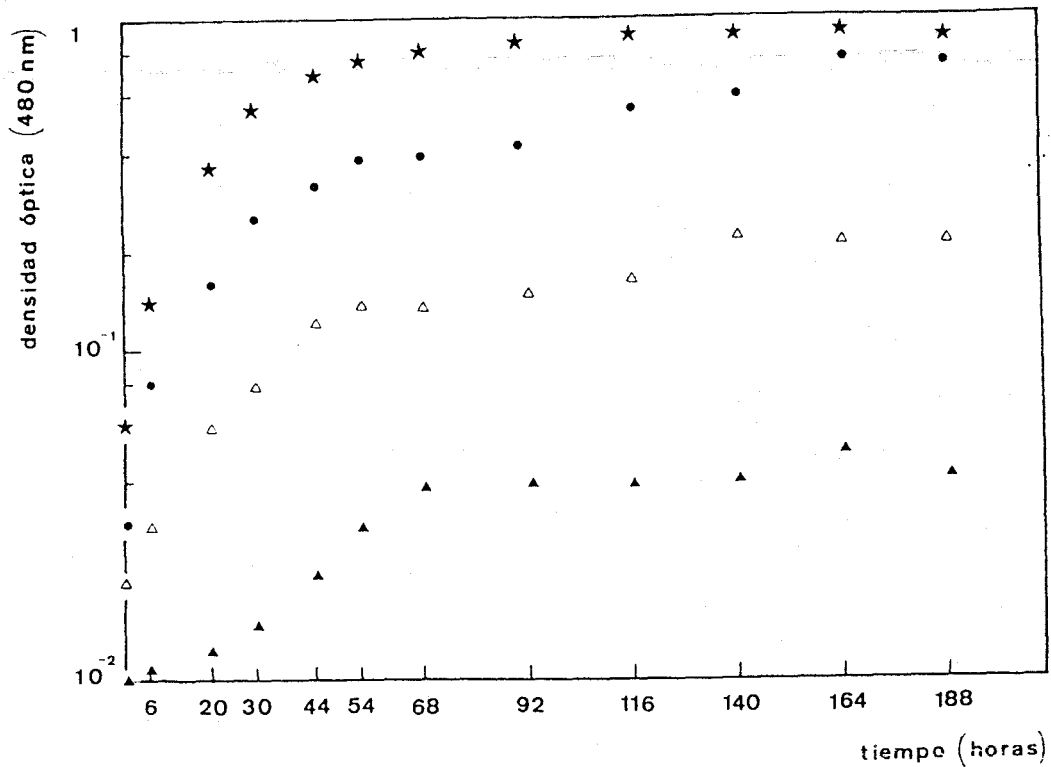


Figura 5. Estudio del crecimiento de las estirpes RS636 y RS672 sembradas en medio mínimo suplementado con histidina e histidina mas glutamina, incubadas a 28°C en agitación.

(▲) Estirpe RS636 en medio mínimo + histidina.

(△) Estirpe RS636 en medio mínimo + histidina + glutamina.

(●) Estirpe RS672 en medio mínimo + histidina.

(★) Estirpe RS672 en medio mínimo + histidina + glutamina.

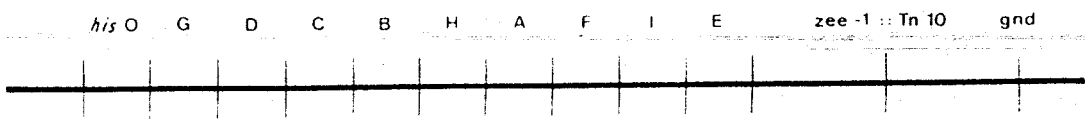
5. AISLAMIENTO DE MUTANTES EN EL GEN hisG

La primera etapa de la biosíntesis de histidina es el consumo de ATP para formar fosforribosil-ATP. Esta etapa está normalmente catalizada por el producto génico del gen hisG que es un enzima con actividad fosforribosiltransferasa (MARTIN, 1963). Este enzima, en Salmonella typhimurium, está estrechamente regulado por inhibición feedback de la actividad enzimática y por represión del operón, (Figura 6).

Cuando coexisten los dos mecanismos de regulación de la actividad fosforribosiltransferasa activos, las células crecen normalmente; pero si se establecen condiciones en las que el producto génico del gen hisG esté liberado de la inhibición feedback y el operón esté desreprimido, las células requieren adenina para su crecimiento, presumiblemente debido al agotamiento del pool de adenina causado por el descontrol de la utilización del ATP en la biosíntesis de la histidina. Puesto que este fenotipo es debido a la acción enzimática del producto génico del gen hisG, una mutación que vuelva inactiva la actividad fosforribosiltransferasa evitará que la célula pierda adenina y, por consiguiente, dicha célula no requerirá adenina para su crecimiento (JOHNSTON & ROTH, 1979).

Una forma de averiguar si los mutantes tienen alguna mutación en el gen hisG es mediante la utilización de auxótrofos a la histidina crecidos sobre una fuente pobre de histidina, que pue

A Operón de la histidina



B Rutas biosintéticas de la histidina y la adenina

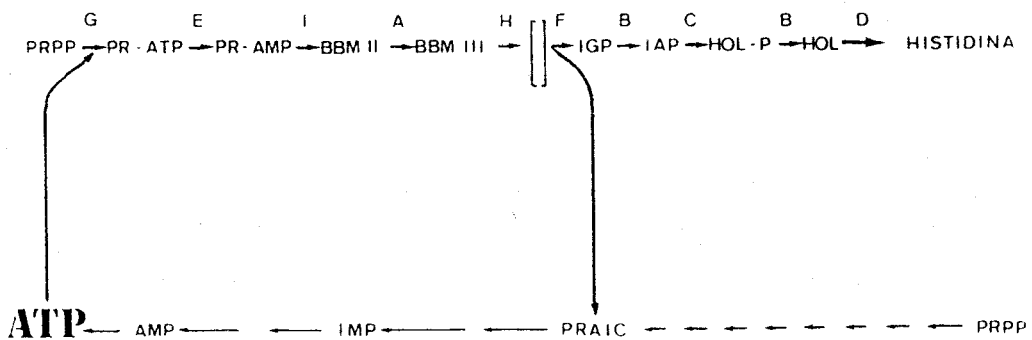


Figura 6. (A) Mapa genético del operón de la histidina. (B) Rutas biosintéticas de la histidina y la adenina. Abreviaturas: PPRP, Fosforribosilpirofosfato; ATP, Adenosina trifosfato; PR-ATP, Fosforribosil-ATP; AMP, Adenosina monofosfato; IMP, Inosina monofosfato; PRAIC, Fosforribosilaminoimidazol carboxamida; BBM II, (Bound Bratton-Marshall Compound) Fosforribosilformimino-PRAIC; BBM III, Fosforribosilformimino-PRAIC; [], intermediario desconocido; IGP, Imidazol glicerol fosfato; IAP, Imidazol acetol fosfato; HOL-P, L-histidinol fosfato; HOL, L-histidinol.

de ser el histidinol.

El histidinol es una fuente pobre de histidina, presumiblemente debido a su ineficaz transporte hacia el interior de la célula. Así, células His⁻ crecidas en medio mínimo suplementado con histidinol están sometidas a hambre de histidina. En estas condiciones algunos tipos de mutantes en el operón de la histidina pueden requerir adenina, como los mutantes hisI, hisA, hisF, hisH, hisB e hisC cuando son cultivados a temperaturas inferiores a la óptima de crecimiento, mientras que este requerimiento no es necesario cuando los mutantes tienen alterado el gen hisG o el gen hisE (JOHNSTON & ROTH, 1979).

En la Tabla VII se muestra el crecimiento de los distintos mutantes en medio mínimo suplementado con L-histidinol, L-histidinol mas adenina y L-histidina, crecidos a distintas temperaturas: t^a óptima de crecimiento 28°C, t^o por debajo de la óptima de crecimiento 18°C y t^a por encima de la óptima de crecimiento 43°C.

En estas condiciones de experimentación solamente crecen las estirpes defectivas en la primera o segunda etapa de la ruta metabólica (mutantes hisG o hisE). Por consiguiente, las estirpes que aquí representamos son mutantes en el gen hisG o hisE, denominándolos hasta ahora mutantes hisGE. En la Tabla se estudia el mutante RS627 clasificado como hisH que presenta crecimiento en medio mínimo con histidinol a 28°C mientras que no crece a 18°C.

Tabla VII. Estudio del crecimiento de varios mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con L-histidina, L-histidinol y L-histidinol + adenina, incubados a 18, 28 y 37°C.

| Estirpes | Crecimiento a 18°C | | Crecimiento a 28°C | | | | Crecimiento a 37°C | |
|----------|--------------------|-------------------|--------------------|----------|-------------------|----------|--------------------|----------|
| | MM + Hol | MM + Hol + Ade | MM | MM + Hol | MM + Hol + Ade | MM + His | MM + Hol | MM + His |
| | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) |
| RS600 | + + | - + | - - | + + | + + | + + | + + | + + |
| RS603 | - + | - + | - - | + + | - + | + + | - + | + + |
| RS608 | - + | - + | - - | + + | - + | + + | - + | + + |
| RS638 | - + | - + | - - | + + | + + | + + | + + | + + |
| RS658 | + + | + + | - - | + + | + + | + + | + + | + + |
| RS627* | - - | - + | - - | - + | - + | + + | - + | + + |

(*) El segundo signo expresa el crecimiento medido a los 7 días de incubación.

(a) Placas incubadas durante 24 horas.

(b) Placas incubadas durante 120 horas.

MM= Medio mínimo.

MM + Hol= Medio mínimo suplementado con L-histidinol (1 mM).

MM + Hol + Ade= Medio mínimo suplementado con L-histidinol (1 mM) y adenina (0,5 mM).

MM + His= Medio mínimo suplementado con L-histidina (0,1 mM).

Esta pérdida de crecimiento que encontramos a 18°C se debe a la dependencia a la temperatura por pérdida de eficiencia en el transporte de histidinol a bajas temperaturas y también al requerimiento de adenina que presenta.

Hasta el momento no se ha podido distinguir entre mutantes hisG e hisE, puesto que las dos reacciones que catalizan los productos génicos de estos genes están estrechamente relacionadas con la actividad de la fosforribosiltransferasa. Es decir, el producto génico del gen hisE es requerido para la formación de fosforribosil-ATP y posterior transformación en fosforribosil-AMP (JOHNSTON & ROTH, 1979).

6. AISLAMIENTO Y ALGUNAS PROPIEDADES DE MUTANTES EN LA UTILIZACION DE D-HISTIDINA.

A los mutantes His⁻ obtenidos por transposición o por tratamiento con nitrosoguanidina, se les comprobó el crecimiento en placas de medio mínimo suplementadas con D-histidina como única fuente de histidina.

Se aislaron aquellas estirpes capaces de crecer en placas suplementadas con D-histidina. En la Tabla VIII se resumen las estirpes que presentaron dicho comportamiento. De los resultados expuestos, se muestra que las estirpes RS600, RS638, RS658 y RS672

Tabla VIII. Crecimiento de distintas estirpes bacterianas en medio mínimo suplementado con D-histidina y L-histidina.

Las placas se incubaron durante 3 días a 28°C.

| Estirpes | Medio mínimo | MM + D-histidina (0,1 mM) | MM + L-histidina (0,1 mM) |
|----------|--------------|------------------------------|------------------------------|
| RS600 | - | ++ | ++ |
| RS603 | - | ++ | ++ |
| RS608 | - | + | ++ |
| RS638 | - | ++ | ++ |
| RS658 | - | ++ | ++ |
| RS671 | - | ++ | ++ |
| RS672 | - | ++ | ++ |

(-) No crecimiento.

(+) Crecimiento normal.

(++) Crecimiento abundante.

crecen abundantemente en D-histidina desde las 24 horas de incubación. Ya que los agentes mutagénicos utilizados producen mutaciones puntuales, el que aparezcan a la vez alterada la capacidad de sintetizar histidina y adquirida la capacidad de utilizar D-histidina como única fuente de este aminoácido, nos sugiere que existe una regulación de la permeasa por la biosíntesis de la histidina. Cuando se encuentran alterados determinados genes del operón, puede ocurrir que no se produzca alguna proteína o sustrato que pudiera mantener bloqueada la síntesis de los productos que participan en la permeación de la histidina. Esta sugerencia hace pensar que la localización de los genes dhu (responsables de la capacidad de utilizar D-histidina como única fuente de histidina) sería dentro del operón de la histidina o en una zona de vecindad muy próxima. Esta idea difiere de la hipótesis propuesta por KRAJEWSKA-GRYNKIEWICZ et al (1971) que indican que, en Salmonella typhimurium, los genes dhu se encuentran alejados del operón de la histidina puesto que al utilizar mutantes de delección en todo el operón y regiones adyacentes siguen apareciendo mutantes dhu. Esta hipótesis puede ser fácilmente revocada con los resultados obtenidos, ya que cinco de los mutantes se obtuvieron con Tn5, y el mecanismo de mutagénesis del transposón es por integración en un solo punto del cromosoma, por lo que solo se vé afectado un gen por dicha mutación.

Sin embargo, esta hipótesis sería cierta siempre que los genes de la histidina se encuentren reunidos formando un operón y que, al igual que en Salmonella typhimurium, el operón se trans-

criba como un ARNm policistrónico. Si los genes dhu están ligados al operón pueden verse afectados por dicha mutación.

Esta propiedad de utilizar D-histidina como única fuente de histidina se mantuvo estable en los citados mutantes.

La distinta capacidad para utilizar D-histidina ha sido estudiada de forma cuantitativa comparando las tasas de crecimiento y rendimientos de cultivo. Se han utilizado las estirpes indicadas en la Tabla anterior, que presentaban crecimiento idóneo en D-histidina. Además de estas estirpes se han utilizado otras que, aunque no figuran en la tabla, presentaron un ligero crecimiento en D-histidina en medio sólido.

En las Figuras 7, 8, 9 y 10 se muestra la variación de la curva de crecimiento de cada una de estas estirpes en medio mínimo con distintas concentraciones de D-histidina (0,01 mM, 0,03 mM y 0,1 mM) y L-histidina (0,03 mM). En ellas queremos destacar los distintos niveles de crecimiento obtenidos, expresados como el incremento de la densidad óptica a tiempo cero hasta la densidad óptica más elevada que se consiga, y también la tasa de crecimiento que presenta cada una de estas estirpes.

Las Figuras 7 y 8 muestran un crecimiento rápido en la utilización de D-histidina obteniéndose rendimientos de crecimiento elevados mientras que en el resto de las Figuras se observa que el

Figura 7. Estudio del crecimiento de las estirpes RS600 (a), RS658 (b), RS620 (c) y RS638 (d) sembradas en medio mínimo suplementado con D-histidina y L-histidina a distintas concentraciones, incubadas a 28°C en agitación.

- (●) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,01 mM).
- (■) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,03 mM).
- (▲) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,1 mM).
- (★) Crecimiento en medio mínimo + L-histidina (0,03 mM).

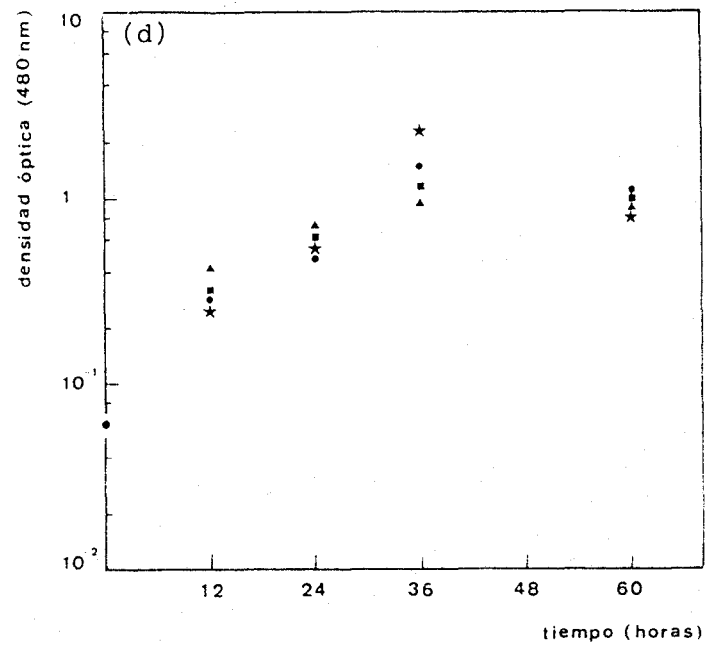
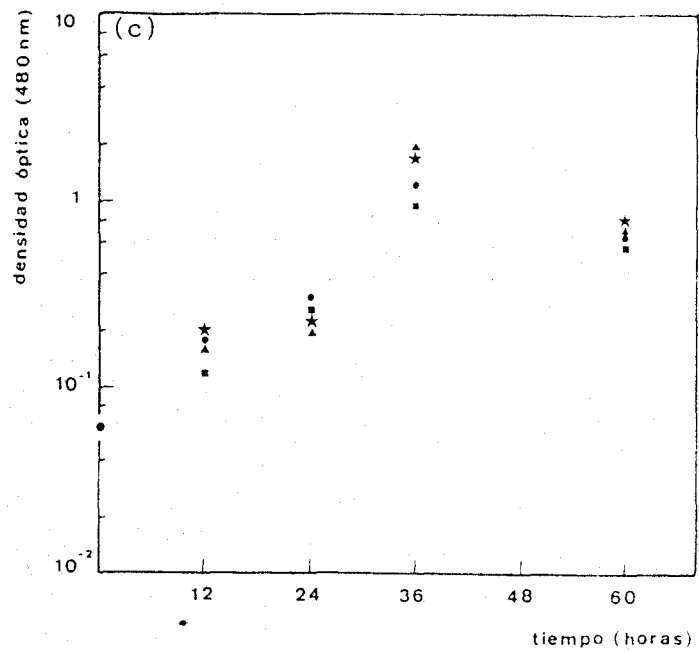
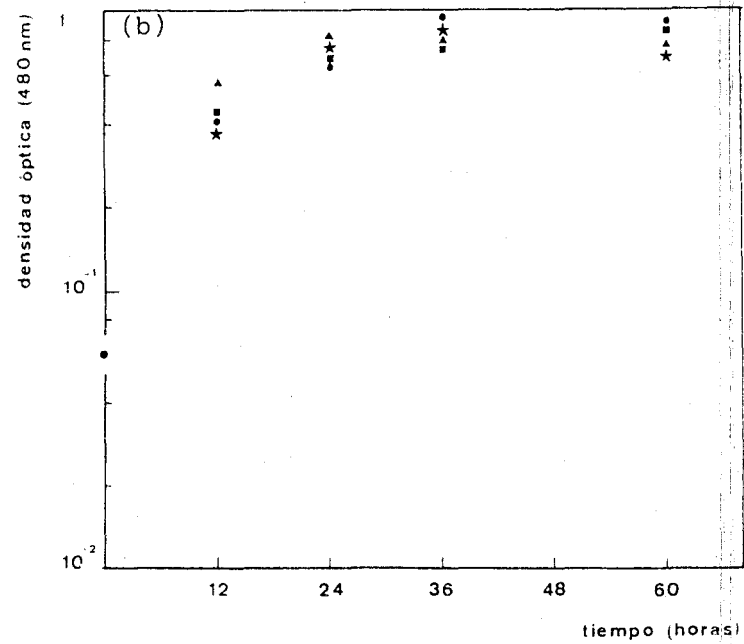
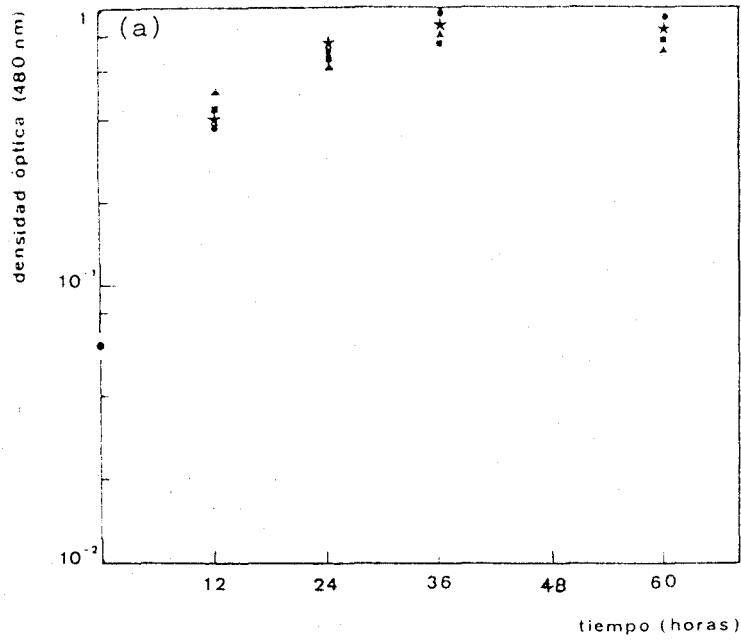


Figura 8. Estudio del crecimiento de las estirpes RS672 (a), RS671

(b) y RS603 (c) sembradas en medio mínimo suplementado con D-histidina y L-histidina a distintas concentraciones, incubadas a 28°C en agitación.

- (●) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,01 mM).
- (■) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,03 mM).
- (▲) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,1 mM).
- (★) Crecimiento en medio mínimo + L-histidina (0,03 mM).

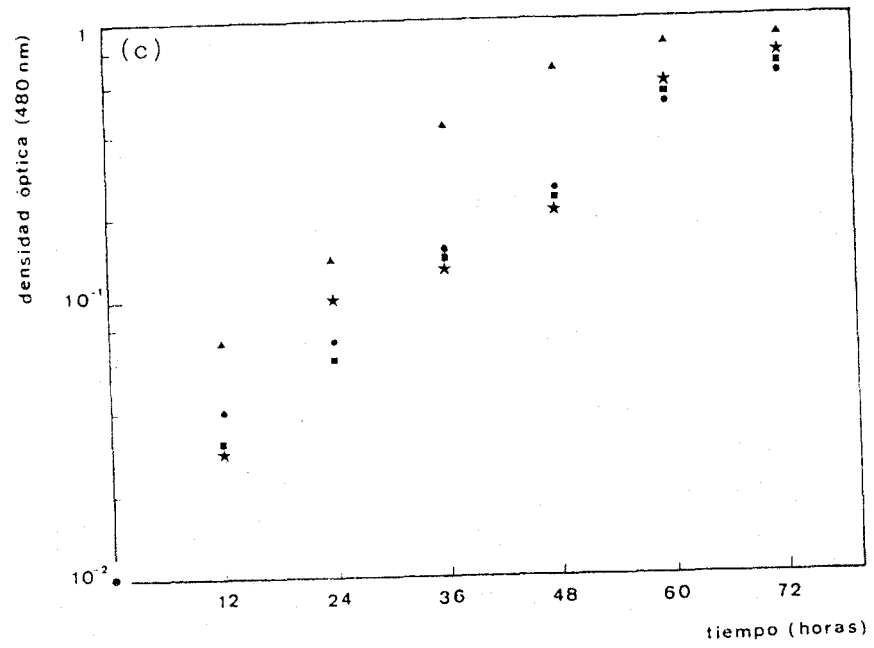
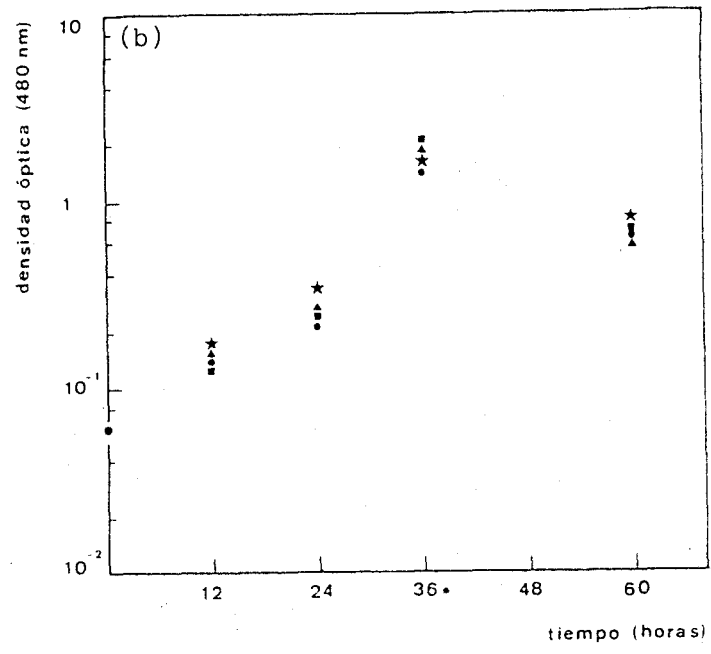
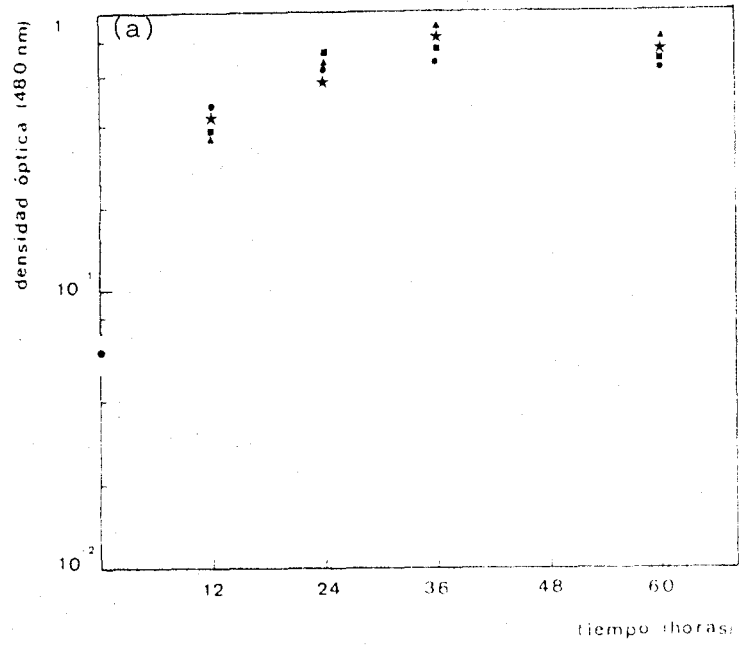


Figura 9. Estudio del crecimiento de las estirpes RS639 (a), RS653 (b), RS640 (c) y RS646 (d) sembradas en medio mínimo suplementado con D-histidina y L-histidina a distintas concentraciones, incubadas a 28°C en agitación.

- (●) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,01 mM).
- (■) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,03 mM).
- (▲) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,1 mM).
- (★) Crecimiento en medio mínimo + L-histidina (0,03 mM).

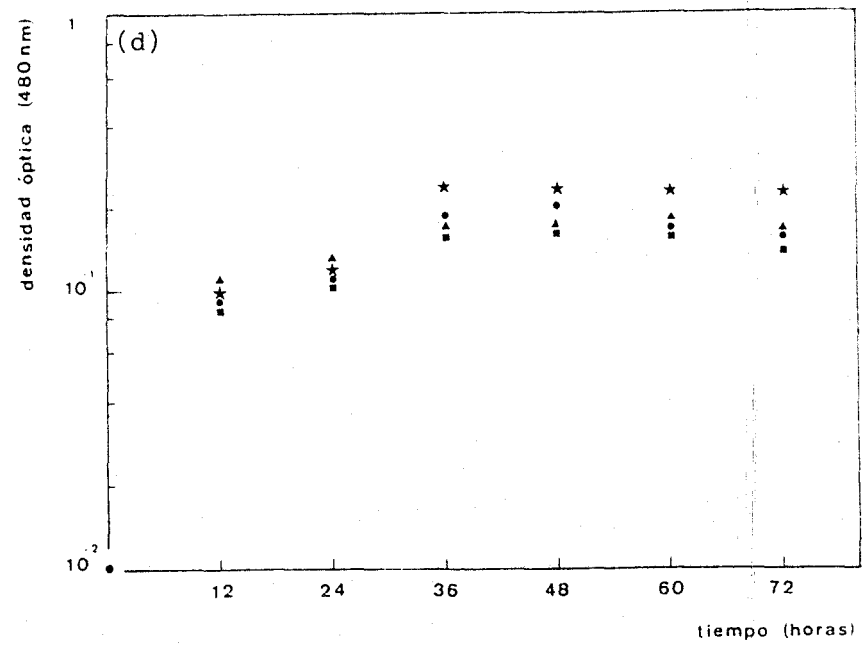
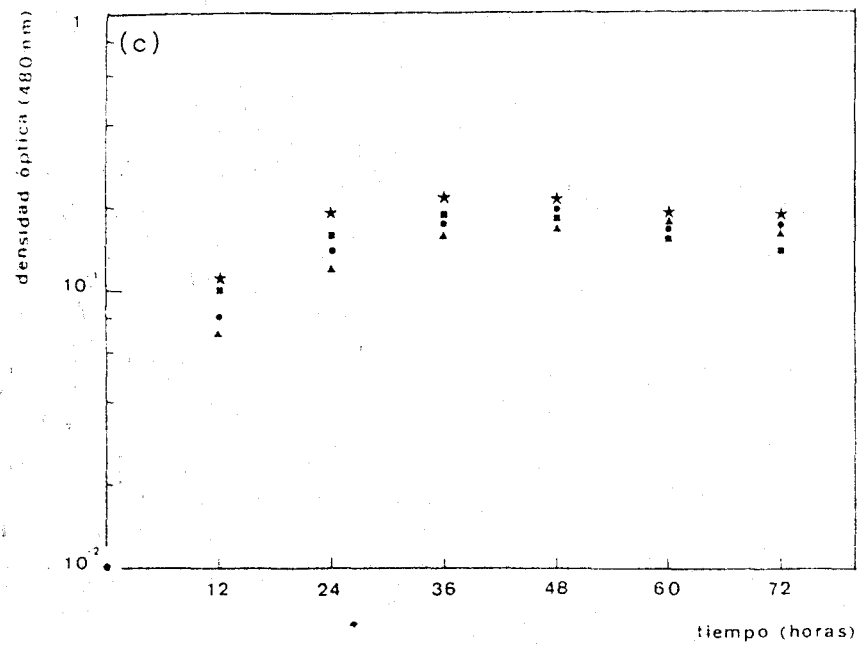
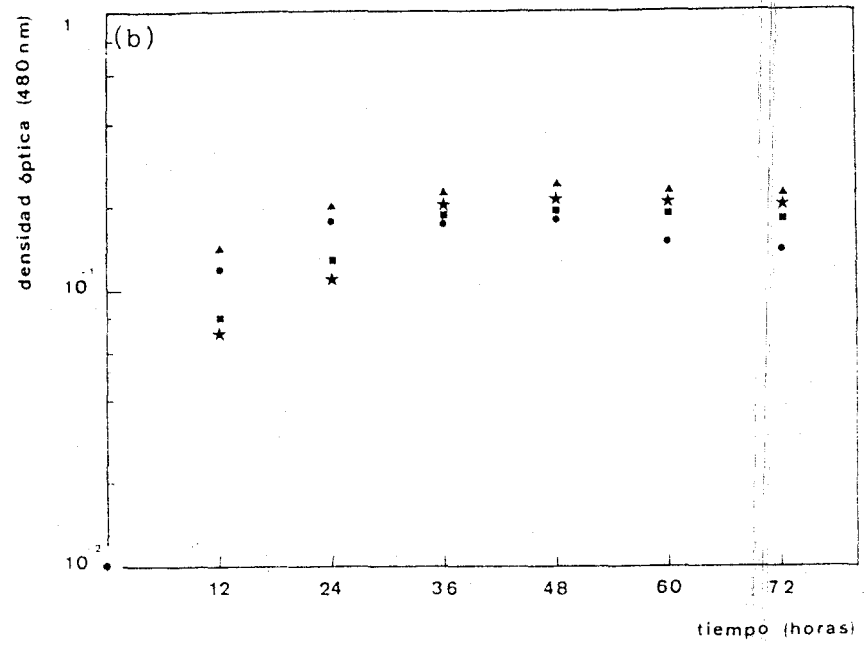
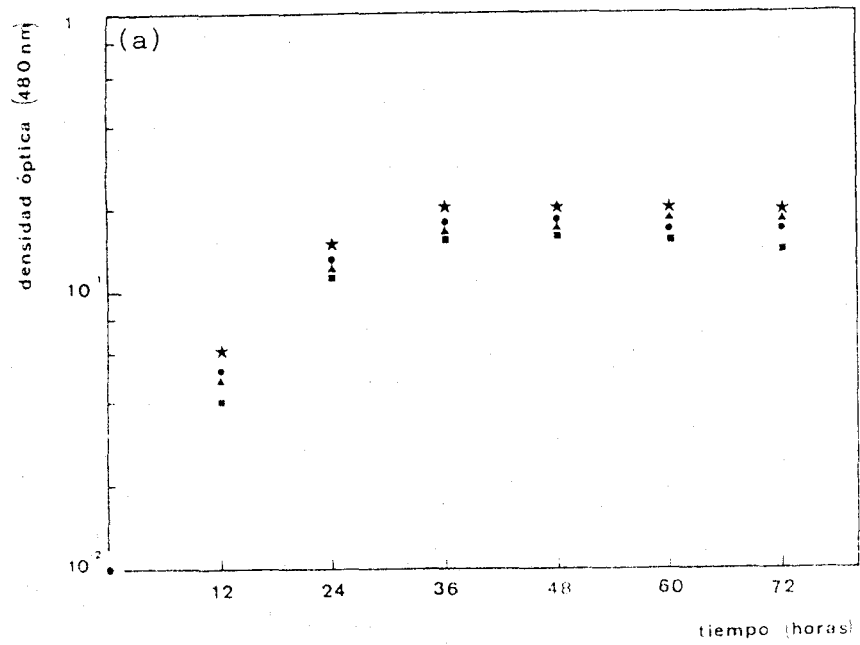
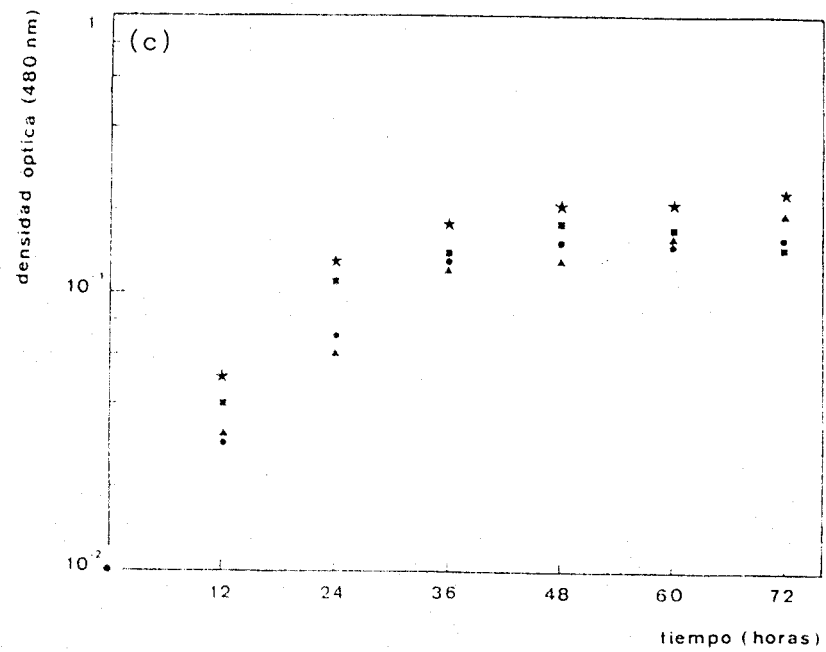
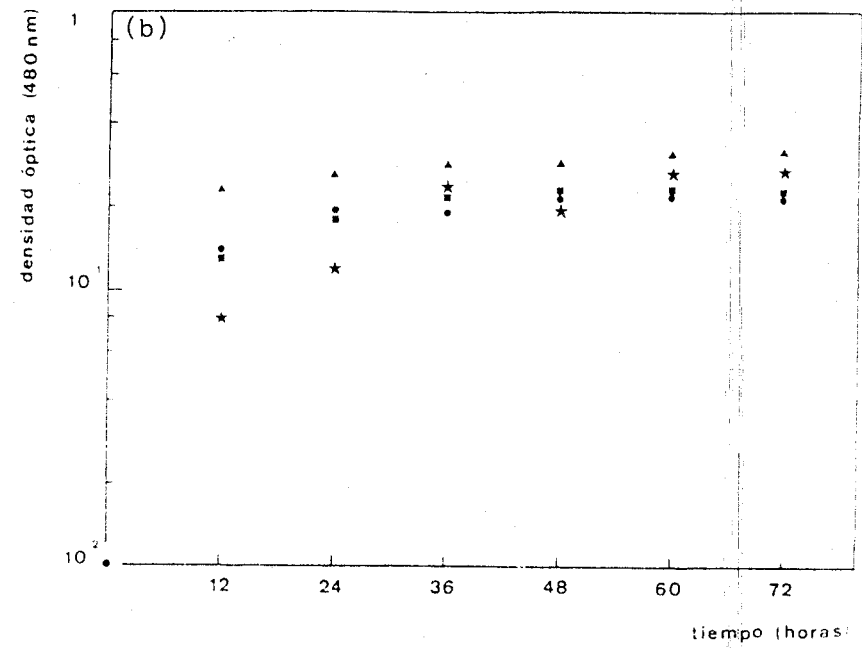
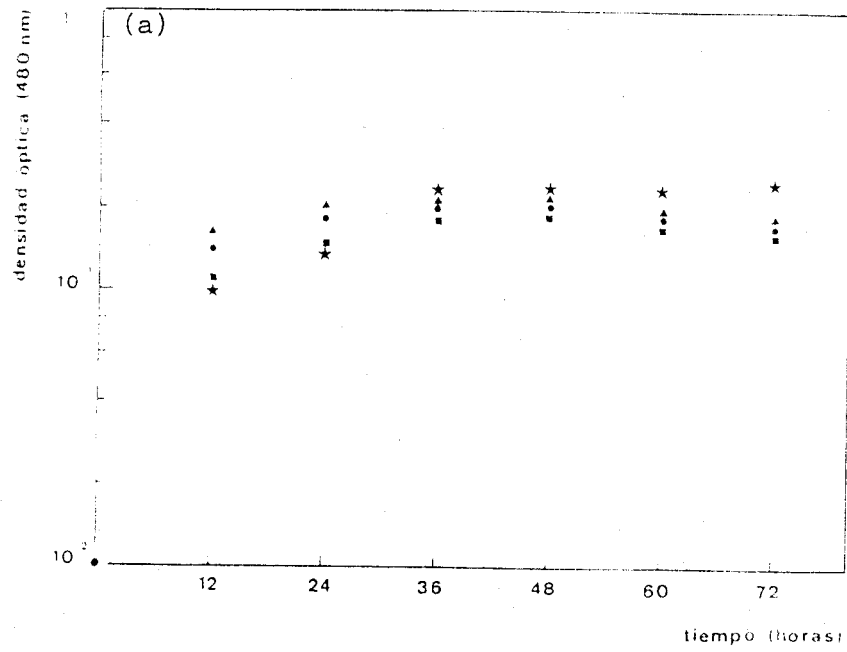


Figura 10. Estudio del crecimiento de las estirpes RS665 (a), RS663 (b) y RS608 (c) sembradas en medio mínimo suplementado con D-histidina y L-histidina a distintas concentraciones, incubadas a 28°C en agitación.

- (●) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,01 mM).
- (■) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,03 mM).
- (▲) Crecimiento en medio mínimo + D-histidina (0,1 mM).
- (★) Crecimiento en medio mínimo + L-histidina (0,03 mM).



rendimiento de crecimiento es bajo y la tasa de crecimiento es bastante inferior a la de las estirpes anteriormente indicadas. Esto muestra una clara correlación con los resultados obtenidos en medio sólido.

KRAJEWSKA-GRYNKIEWICZ et al (1971) hacen la distinción de los mutantes dhu en mutantes dhuA, que no presentan variaciones apreciables en las tasas de crecimiento a las distintas concentraciones de D-histidina, y mutantes dhuB, que presentan generalmente crecimientos en D-histidina inferiores a los conseguidos en L-histidina e incluso no son capaces de crecer cuando la concentración de D-histidina es de 0,01 mM o menor. Basándonos en ello se puede indicar que todos los mutantes estudiados en este capítulo son mutantes dhuA His⁻ no observándose la aparición de ningún mutante dhuB His⁻. Por consiguiente podemos clasificar como mutantes dhuA His⁻ a las estirpes de Rhizobium trifolii RS600, RS603, RS608, RS638, RS658, RS671 y RS672.

Con respecto al resto de las estirpes mostradas en las Figuras, se puede pensar que el rendimiento de crecimiento en D-histidina, que en todos los casos es similar al que presentan con L-histidina 0,03 mM, sea debido a una alteración en la permeasa de la histidina que impida pasen al interior las cantidades suficientes de D-histidina requeridas para los procesos de racemización y no a que estas estirpes carezcan de dichas enzimas de racemización. Por consiguiente no podemos llegar a postular qué tipo de mutantes

son estas estirpes ya que no presentan un comportamiento similar a ninguno de los descritos hasta el momento en la bibliografía.

Por otro lado, fué interesante estudiar la influencia que tiene la temperatura sobre el consumo de D-histidina, para ver si la permeasa de la histidina en Rhizobium trifolii es sensible a la temperatura. Se estudió el comportamiento de las distintas estirpes utilizadoras de D-histidina en medio mínimo suplementado con L- y D-histidina a distintas temperaturas de incubación: 18°C, 28°C, 37°C y 43°C. En la Tabla IX se muestran los resultados obtenidos después de 5 días de incubación.

De la Tabla IX se deduce que a 43°C no crece Rhizobium trifolii y que a las temperaturas de 18°C y 37°C, fuera de la óptima de crecimiento, presentan un crecimiento considerable. Se observa que la temperatura no actúa sobre la permeasa inhibiendo totalmente el consumo de D-histidina, aunque sí se observa una disminución en el nivel de transporte de la histidina a esta temperatura.

Dado que en Salmonella typhimurium y Escherichia coli existen las dos permeasas indicadas para el transporte de la histidina (AMES, 1964), hemos investigado la posible existencia de algún efecto inhibitorio o competitivo de los aminoácidos aromáticos frente a la histidina, lo que nos daría algún indicio sobre la existencia de más de una permeasa.

Tabla IX. Estudio del comportamiento de distintos mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con D-his_{tidina} y L-histidina, incubados a distintas temperaturas.

| Estirpes | Medio mínimo + D-histidina (0,3 mM) | | | | Medio mínimo + L-histidina (0,1 mM) | | | | Medio mínimo |
|----------|--|--------|--------|--------|--|--------|--------|--------|--------------------------------------|
| | Temperatura de incubación | | | | Temperatura de incubación | | | | Temperatura de incubación 28°C |
| | 18°C | 28°C | 37°C | 43°C | 18°C | 28°C | 37°C | 43°C | |
| | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) | (a)(b) |
| RS600 | - + | + + | + + | - - | + + | + + | + + | - - | - - |
| RS603 | - + | + + | - + | - - | + + | + + | + + | - - | - - |
| RS608 | - + | - + | - + | - - | + + | + + | + + | - - | - - |
| RS638 | - + | + + | - + | - - | + + | + + | + + | - - | - - |
| RS658 | + + | + + | + + | - - | + + | + + | + + | - - | - - |
| RS671 | - - | + + | - + | - - | + + | + + | + + | - - | - - |
| RS672 | - + | + + | + + | - - | + + | + + | + + | - - | - - |

(a) Placas incubadas durante 24 horas.

(b) Placas incubadas durante 72 horas.

(-) No crecimiento.

(+) Crecimiento.

En las Tablas X y XI se exponen los resultados obtenidos del crecimiento de los mutantes auxótrofos a la histidina frente a los aminoácidos aromáticos y en competitividad con la histidina. De este experimento se esperaba un retraso en el crecimiento o un rendimiento menor en el cultivo cuando estuviesen presentes los aminoácidos aromáticos, lo que podría sugerir la existencia de únicamente la permeasa para aminoácidos aromáticos y no de la específica para el transporte de histidina en Rhizobium trifolii.

De los resultados obtenidos se deduce que existen efectivamente ambas permeasas, pues no se observa competencia de los aminoácidos aromáticos con la histidina. El hecho de que no se vea alterado el crecimiento por la presencia de L-arginina y L-triptófano apoya la idea de que los mutantes dhu tienen desreprimida la actividad de la permeasa de la histidina (KRAJEWSKA-GRYNKIEWICZ et al, 1971).

Al realizar este estudio en todos los mutantes se obtuvo un resultado aparentemente anómalo en el mutante RS603. Este mutante no crece en presencia de medio mínimo suplementado con histidina y triptófano. En la Figura 11 se muestra el crecimiento del mutante en medio mínimo líquido suplementado con histidina y distintas concentraciones de triptófano, incubado a 28°C en agitación. En cada uno de los cultivos se obtuvieron tasas de crecimiento muy similares, por lo que se concluye que dicho mutante no presenta un comportamiento anormal respecto al resto de los mutantes estudia-

Tabla X. Estudio del crecimiento de los mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con distintos aminoácidos aromáticos y con histidina. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días.

| Estirpes | MM + His | MM + Tyr | MM + Trp | MM + Phe |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| RS600 | + | - | - | - |
| RS603 | + | - | - | - |
| RS608 | + | - | - | - |
| RS620 | + | - | - | - |
| RS622 | + | - | - | - |
| RS624 | + | - | - | - |
| RS625 | + | - | - | - |
| RS626 | + | - | - | - |
| RS627 | + | - | - | - |
| RS628 | + | - | - | - |
| RS629 | + | - | - | - |
| RS630 | + | - | - | - |
| RS631 | + | - | - | - |
| RS632 | + | - | - | - |

(-) No crecimiento.

(...)

(+) Crecimiento.

MM + His= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l).

MM + Tyr= Medio mínimo suplementado con DL-tyrosina (40 mg/l).

MM + Trp= Medio mínimo suplementado con DL-triptófano (40 mg/l).

MM + Phe= Medio mínimo suplementado con DL-fenilalanina (40 mg/l).

Tabla X. Estudio del crecimiento de los mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con distintos aminoácidos aromáticos y con histidina. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. (continuación)

| Estirpes | MM + His | MM + Tyr | MM + Trp | MM + Phe |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| RS633 | + | - | - | - |
| RS634 | + | - | - | - |
| RS636 | + | - | - | - |
| RS638 | + | - | - | - |
| RS639 | + | - | - | - |
| RS640 | + | - | - | - |
| RS646 | + | - | - | - |
| RS653 | + | - | - | - |
| RS658 | + | - | - | - |
| RS661 | + | - | - | - |
| RS663 | + | - | - | - |
| RS665 | + | - | - | - |
| RS671 | + | - | - | - |
| RS672 | + | - | - | - |

(-) No crecimiento.

(+) Crecimiento.

MM + His= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l).

MM + Tyr= Medio mínimo suplementado con DL-tirosina (40 mg/l).

MM + Trp= Medio mínimo suplementado con DL-triptófano (40 mg/l).

MM + Phe= Medio mínimo suplementado con DL-fenilalanina (40 mg/l).

Tabla XI. Estudio del crecimiento de los mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con histidina mas aminoácidos aromáticos y leucina. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días.

| Estirpes | MM + His + Leu | MM + His + Tyr | MM + His + Trp | MM + His + Phe |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| RS600 | + | + | + | + |
| RS603 | + | + | - | + |
| RS608 | + | + | + | + |
| RS620 | + | + | + | + |
| RS622 | + | + | + | + |
| RS624 | + | + | + | + |
| RS625 | + | + | + | + |
| RS626 | + | + | + | + |
| RS627 | + | + | + | + |
| RS628 | + | + | + | + |
| RS629 | + | + | + | + |
| RS630 | + | + | + | + |
| RS631 | + | + | + | + |
| RS632 | + | + | + | + |

(-) No crecimiento.

(...)

(+) Crecimiento.

MM + His + Leu= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-leucina (40 mg/l).

MM + His + Tyr= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-tirosina (40 mg/l).

MM + His + Trp= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-triptófano (40 mg/l).

MM + His + Phe= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-fenilalanina (40 mg/l).

Tabla XI. Estudio del crecimiento de los mutantes His⁻ en medio mínimo suplementado con histidina mas aminoácidos aromáticos y leucina. Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. (continuación)

| Estirpes | MM + His + Leu | MM + His + Tyr | MM + His + Trp | MM + His + Phe |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| RS633 | + | + | + | + |
| RS634 | + | + | + | + |
| RS636 | + | + | + | + |
| RS638 | + | + | + | + |
| RS639 | + | + | + | + |
| RS640 | + | + | + | + |
| RS646 | + | + | + | + |
| RS653 | + | + | + | + |
| RS658 | + | + | + | + |
| RS661 | + | + | + | + |
| RS663 | + | + | + | + |
| RS665 | + | + | + | + |
| RS671 | + | + | + | + |
| RS672 | + | + | + | + |

(-) No crecimiento.

(+) Crecimiento.

MM + His + Leu= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-leucina (40 mg/l).

MM + His + Tyr= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-tirosina (40 mg/l).

MM + His + Trp= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-triptófano (40 mg/l).

MM + His + Phe= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l) y con DL-fenilalanina (40 mg/l).

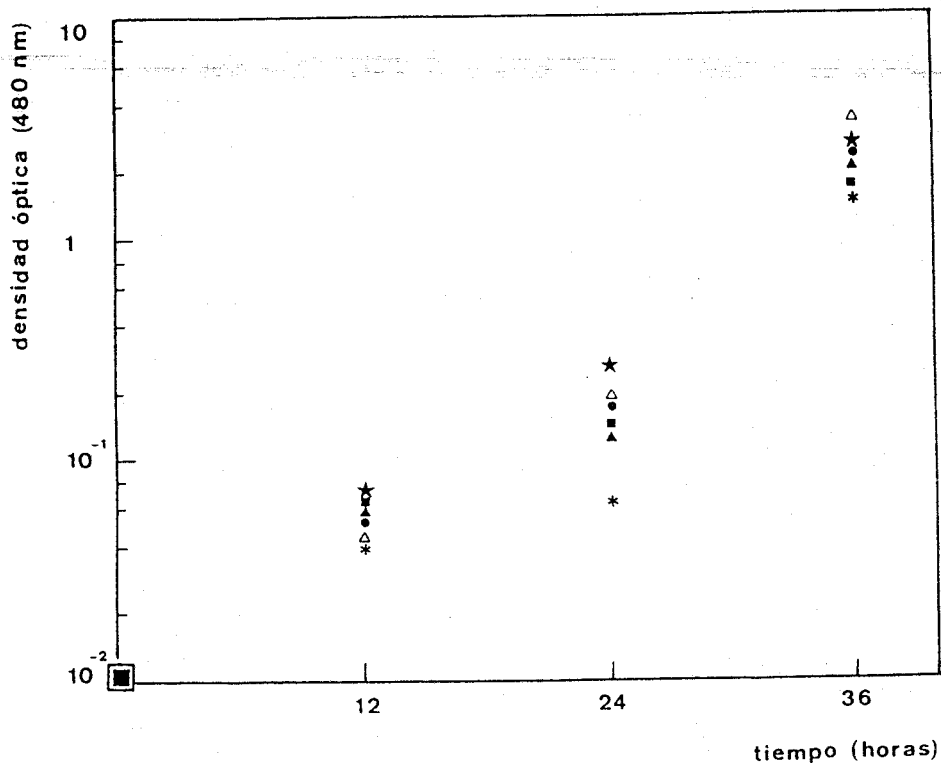


Figura 11. Estudio del crecimiento de la estirpe RS603 sembrada en medio mínimo suplementado con:

- (★) histidina (40 mg/l).
- (*) histidina (40 mg/l) y triptófano (80 mg/l).
- (▲) histidina (40 mg/l) y triptófano (40 mg/l).
- (■) histidina (40 mg/l) y triptófano (20 mg/l).
- (●) histidina (40 mg/l) y triptófano (10 mg/l).
- (△) histidina (40 mg/l) y triptófano (5 mg/l).

dos, si bien, por causas que desconocemos, presenta un comportamiento diferente cuando se cultiva en medio mínimo sólido adicionado de histidina y triptófano a concentraciones equimoleculares.

7. CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES EN MEDIO MINIMO CON ARGININA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO.

Puesto que, como se indica en el apartado anterior, los mutantes en las permeasas del transporte de histidina (dhu) tienen alterada su regulación, pareció interesante investigar si existía en estos mutantes un defecto en la permeasa específica de la histidina. Este defecto estructural en Salmonella typhimurium es causado por la ausencia del producto génico del gen hisP (AMES & ROTH, 1968; KUSTU & AMES, 1973).

La proteína hisP es también un componente del sistema de transporte de la arginina. Así, en Salmonella typhimurium, cuando una estirpe His⁻ se cultiva en presencia de histidina y arginina, siendo la arginina la única fuente de nitrógeno, si el mutante crece en dicho medio se debe a que los componentes del transporte de la arginina no están alterados; ahora bien, si le aportamos ambos aminoácidos y no crece, es indicativo de que está alterado un componente del transporte de la arginina (KUSTU & AMES, 1973).

Para estudiar la aparición de mutantes hisP, se mide el

crecimiento en medio mínimo suplementado con arginina como única fuente de nitrógeno en mutantes que requieren histidina.

En la Tabla XII se muestra el crecimiento de todos los mutantes His⁻ y de la estirpe silvestre de la que proceden, en los siguientes medios: Medio mínimo sin fuente de N₂ suplementado con arginina, Medio mínimo sin fuente de N₂ suplementado con arginina e histidina y Medio mínimo con fuente de N₂ suplementado con histidina tras incubación a 28°C.

De los resultados obtenidos se deduce que Rhizobium trifolii es incapaz de utilizar la arginina como única fuente de nitrógeno, por lo que todas las estirpes estudiadas hasta el momento en Rhizobium trifolii carecen de los genes aut.

8. AISLAMIENTO DE R-primas PARA ESTUDIOS DE COMPLEMENTACION.

Los estudios de las distintas mutaciones His⁻ obtenidas por los tratamientos mutagénicos ya indicados, pueden ser clasificadas por métodos de análisis químico que implican experiencias puramente bioquímicas. Además las mutaciones en los genes hisD pueden ser clasificadas directamente por producirse o no crecimiento en presencia de histidinol.

Estos hechos hacen que la clasificación de mutantes del

Tabla XII. Estudio del crecimiento de 28 mutantes His⁻ y la estirpe silvestre 8003 en medio mínimo sin fuente de nitrógeno suplementado con arginina y arginina mas histidina. Las placas se incubaron a 28°C durante 7 días.

| Estirpes | MM _{sn} + Arg | MM _{sn} + Arg + His | MM + His |
|----------|------------------------|------------------------------|----------|
| RS600 | - | - | + |
| RS603 | - | - | + |
| RS608 | - | - | + |
| RS620 | - | - | + |
| RS622 | - | - | + |
| RS624 | - | - | + |
| RS625 | - | - | + |
| RS626 | - | - | + |
| RS627 | - | - | + |
| RS628 | - | - | + |
| RS629 | - | - | + |
| RS630 | - | - | + |
| RS631 | - | - | + |
| RS632 | - | - | + |

(...)

MM_{sn} + Arg= Medio mínimo sin fuente de nitrógeno suplementado con DL-arginina (10 mM).

MM_{sn} + Arg + His= Medio mínimo sin fuente de nitrógeno suplementado con DL-arginina (10 mM) y L-histidina (40 mg/l).

MM + His= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l).

(-) No crecimiento.

(+) Crecimiento.

Tabla XII. Estudio del crecimiento de 28 mutantes His⁻ y la estirpe silvestre 8003 en medio mínimo sin fuente de nitrógeno suplementado con arginina y arginina mas histidina. Las placas se incubaron a 28°C durante 7 días (continuación)

| Estirpes | MM _{sn} + Arg | MM _{sn} + Arg + His | MM + His |
|----------|------------------------|------------------------------|----------|
| RS633 | - | - | + |
| RS634 | - | - | + |
| RS636 | - | - | + |
| RS638 | - | - | + |
| RS639 | - | - | + |
| RS640 | - | - | + |
| RS646 | - | - | + |
| RS653 | - | - | + |
| RS658 | - | - | + |
| RS661 | - | - | + |
| RS663 | - | - | + |
| RS665 | - | - | + |
| RS671 | - | - | + |
| RS672 | - | - | + |
| RS8003 | - | - | + |

MM_{sn} + Arg= Medio mínimo sin fuente de nitrógeno suplementado con DL-arginina (10 mM).

MM_{sn} + Arg + His= Medio mínimo sin fuente de nitrógeno suplementado con DL-arginina (10 mM) y L-histidina (40 mg/l).

MM + His= Medio mínimo suplementado con L-histidina (40 mg/l).

(-) No crecimiento.

(+) Crecimiento.

operón de la histidina se pueda realizar mediante dos estrategias distintas: una, por análisis bioquímico de los intermediarios acumulados y otra, por análisis genético mediante complementación con mutantes ya perfectamente clasificados de Salmonella typhimurium o Escherichia coli.

Para estudios de complementación debemos obtener previamente R-primas. De acuerdo a los mutantes que tenemos, éstas pueden proceder de los mutantes obtenidos por transposición con Tn5 o de los mutantes obtenidos con nitrosoguanidina. En principio, solo dedicamos nuestra atención a la construcción de R-primas procedentes de mutantes obtenidos por transposición. En ellos se ha estudiado la complementación con distintos mutantes de Salmonella typhimurium y la complementación con las distintas estirpes auxótrofas para la histidina de Rhizobium trifolii que poseíamos.

La construcción de R-primas de mutantes obtenidos por transposición implica que en el factor R-prima vaya, además del factor R, el transposón Tn5 y un fragmento de material cromosómico que presumiblemente lleve los genes de la histidina.

Para la obtención de los R-primas de Tn5 se ha seguido la técnica descrita en Métodos, apartado 9.1. El primer cruce se realizó entre Escherichia coli 1830 que lleva el plásmido pJB3JI, que es un plásmido Tra⁺ (transferencia) y cma (habilidad de movilizar material cromosómico) cruzado mediante conjugación ininterrum-

pida por una estirpe de Rhizobium trifolii obtenida por mutagénesis con Tn5, que presuponemos lleva insertado el Tn5 en algún gen de la biosíntesis de la histidina. Se seleccionaron los transconjugantes que llevaban el plásmido pJB3JI y el transposón Tn5 por inoculación en los medios adecuados.

En la Tabla XIII se muestra la frecuencia de conjugación obtenida en la elaboración de cinco R-primas diferentes.

Posteriormente se toman 200 colonias transconjugantes, que en este caso se van a comportar como células donadoras, y se cruzan mediante conjugación ininterrumpida en botón de crecimiento con una estirpe receptora de Rhizobium trifolii protótrofa y resistente a un antibiótico distinto al que lleva la célula donadora. Tras un periodo de incubación de 24 horas se obtienen transconjugantes sembrándolos en placas que contienen los antibióticos a los cuales confiere resistencia el plásmido, el transposón y la resistencia cromosómica que posee la célula receptora.

Adoptando como criterio de aparición de transconjugantes R-primas el que crezca en más del 50% de la superficie estriada, se obtienen varios R-primas que en este caso poseen o se supone que poseen el plásmido, el transposón y material cromosómico cercano al lugar de inserción del transposón.

A las estirpes R-primas así conseguidas se les prueba

Tabla XIII. Estudio de la transferencia del plásmido pJB3JI desde Escherichia coli a distintas estirpes de Rhizobium trifolii.

| Estirpe donadora | Estirpe receptora | Nº células receptoras | Frecuencia de transconjugantes* |
|----------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------------------|
| <u>E.coli</u> 1830(pJB3JI) | RS600 | $3,98 \times 10^8$ | $5,97 \times 10^{-8}$ |
| <u>E.coli</u> 1830(pJB3JI) | RS603 | $1,50 \times 10^7$ | $9,20 \times 10^{-5}$ |
| <u>E.coli</u> 1830(pJB3JI) | RS661 | $5,50 \times 10^9$ | $2,25 \times 10^{-7}$ |
| <u>E.coli</u> 1830(pJB3JI) | RS671 | $2,25 \times 10^8$ | $1,25 \times 10^{-5}$ |
| <u>E.coli</u> 1830(pJB3JI) | RS672 | $2,31 \times 10^8$ | $5,28 \times 10^{-6}$ |

(*) Referida a células donadoras.

si son capaces de movilizar con igual frecuencia los genes que confieren resistencia a la tetraciclina (que van contenidos en el plásmido pJB3JI) y los genes que confieren resistencia a la kanamicina (que van contenidos en el transposón Tn5). En la Tabla XIV se estudia la transferencia del factor R-prima desde Rhizobium trifolii hasta un receptor determinado de Rhizobium trifolii estudiando el crecimiento de los transconjugantes en medios YT con kanamicina, tetraciclina y kanamicina mas tetraciclina. De los resultados obtenidos se demuestra que la frecuencia de la resistencia plasmídica y de la resistencia portada por el transposón son del mismo orden de magnitud, por lo que podemos considerar que efectivamente son estirpes R-primas estables.

Estos R-primas fueron utilizados en experimentos de complementación con Salmonella typhimurium. El fenotipo que presentan los R-primas obtenidos se muestra en Materiales, apartado 2. El estudio de la complementación se realizó mediante conjugación ininterrumpida entre cada uno de los R-primas obtenidos y las distintas estirpes de Salmonella typhimurium citadas en Materiales, apartado 2.

La conjugación ininterrumpida entre Salmonella y Rhizobium se realizó por distintos métodos: en botón de crecimiento y en medio líquido. Se seleccionaron las estirpes transconjugantes de Salmonella en agar MacCONKEY base sin carbohidratos al cual se le añade manitol y los antibióticos a los que confiere resistencia el

Tabla XIV. Transferencia del factor R' desde Rhizobium trifolii a Rhizobium trifolii.

| Donador | Receptor | Nº células receptoras | Frecuencia de transferencia de resistencia a los antibióticos | | |
|------------|----------|-----------------------|---|----------------------|----------------------|
| | | | YT + XK | YT + XT | YT + XKT |
| RS600 R'1 | 8004 | $4,1 \times 10^9$ | $3,0 \times 10^{-1}$ | $2,5 \times 10^{-2}$ | $1,9 \times 10^{-2}$ |
| RS603 R'1 | 8004 | $6,4 \times 10^9$ | $2,3 \times 10^{-1}$ | $8,6 \times 10^{-2}$ | $8,8 \times 10^{-2}$ |
| RS672 R'50 | 8003 | $2,3 \times 10^7$ | $3,9 \times 10^{-5}$ | $4,0 \times 10^{-5}$ | $4,0 \times 10^{-5}$ |

K= Kanamicina.

T= Tetraciclina.

X= indica el antibiótico al cual confiere resistencia la mutación cromosómica de la estirpe receptora.

En los dos primeros cruces es estreptomomicina y en el último es rifampicina.

plásmido pJB3JI y el transposón Tn5, indicio de que ha ocurrido la transferencia de material genético desde Rhizobium trifolii hasta Salmonella typhimurium.

De los resultados obtenidos se deduce que no existe conjugación entre ambas; por consiguiente no pudimos realizar complementación con los mutantes His⁻ de Salmonella.

En el futuro se han de utilizar para la clasificación de los mutantes, bien estirpes His⁻ de Escherichia coli o bien realizar la complementación con Salmonella mediante transformación con los plásmidos de la misma.

9. GRUPOS DE COMPLEMENTACION ENTRE ESTIRPES R-primas Y TODOS LOS MUTANTES His⁻ OBTENIDOS.

El establecimiento de los grupos de complementación se realizó mediante conjugación ininterrumpida entre los R-primas obtenidos de distintas estirpes y los distintos mutantes His⁻ de Rhizobium trifolii que, previo a la conjugación, tuvieron que obtenerse mutantes resistentes espontáneos a un antibiótico distinto a la resistencia cromosómica que posee la estirpe R-prima empleada.

La frecuencia espontánea de aparición de resistencia a la rifampicina (antibiótico elegido por ser diferente al del R-pri

ma utilizado en la complementación) fué del orden de 10^{-7} . Estas estirpes receptoras, que fueron todas las estirpes que figuran en Materiales, Tabla III, se cruzaron por duplicado mediante conjugación ininterrumpida con la estirpe RS672 R'50.

Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo adicionado de rifampicina, kanamicina y tetraciclina, y los resultados indican que no existe complementación entre ninguno de los mutantes obtenidos y la estirpe R-prima utilizada. La ausencia de complementación y la presencia de transferencia del plásmido y el transposón a la célula receptora nos hace pensar que los genes del operón de la histidina en Rhizobium trifolii pueden o no encontrarse reunidos en un solo bloque, puesto que para afirmar que el operón de la histidina va en un grupo ligado en Rhizobium debería haber existido complementación.

De estos resultados se deduce, como consecuencia práctica, que dada la naturaleza de la mutación que se realiza mediante transposición para los estudios de grupos de complementación es preferible el uso de estirpes R-primas procedentes de mutantes obtenidos con nitrosoguanidina.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se estudia la obtención y clasificación genética de 28 mutantes auxótrofos de la biosíntesis de la histidina. De los resultados expuestos se llega a las siguientes conclusiones:

1. En Rhizobium trifolii existen las dos permeasas descritas en otros géneros bacterianos, para la introducción de la histidina en el interior de la célula: la permeasa específica para la histidina y la permeasa común para los aminoácidos aromáticos y la histidina.
2. En Rhizobium trifolii existen los enzimas encargados de la racemización de la D-histidina a L-histidina.
3. El género Rhizobium no puede utilizar la arginina como única fuente de nitrógeno, lo que indica que estas bacterias carecen de los genes aut.
4. Por los métodos empleados, no se muestra transferencia intergenérica de material genético desde Rhizobium trifolii a Salmonella typhimurium.
5. Los mutantes His⁻ estudiados se han clasificado como:

hisD estirpes RS671 y RS672

hisGE estirpes RS600, RS603, RS638 y RS658.

hisH estirpes RS608, RS620, RS622, RS624, RS625,
RS626, RS627, RS628, RS629, RS630,
RS631, RS632, RS633, RS634, RS636,
RS639, RS640, RS646, RS653, RS661,
RS663 y RS665.

BIBLIOGRAFIA

- AHMED A, CASE ME, GILES NH (1964) The nature of complementation among mutants in the histidine-3 region of Neurospora crassa. Brookhaven Symp Biol 17: 53-65
- AL-ANI FY (1976a) Optimum conditions for isolation of auxotrophs in Rhizobium trifolii strain W19. Bull Coll Sci Vol 17 n° 1: 3-20
- AL-ANI FY (1976b) A chromosome replication map of Rhizobium trifolii strain W19. Bull Coll Sci Vol 17 n° 2: 3-23
- AL-BAYATTI K, AL-ANI FY (1977) A chromosome replication map of Rhizobium trifolii strain K. Bull Coll Sci Vol 18 n° 1: 3-25
- AMEMURA A, HARADA T (1983) Structural studies on extracellular acidic polysaccharides secreted by three non-nodulating Rhizobia. Carbohydrate Research 112: 85-93
- AMES GF (1964) Uptake of amino acids by Salmonella typhimurium. Arch Biochem Biophys 104: 1-18
- AMES BN, GARRY B (1959) Coordinate repression of the synthesis of four histidine biosynthetic enzymes by histidine. Proc Natl Acad Sci USA 45: 1453-1461

- AMES BN, HARTMAN PE (1963) The histidine operon. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 28: 349-356
- AMES GF, ROTH JR (1968) Histidine and aromatic permeases of Salmonella typhimurium. J Bacteriol 96: 1742-1749
- ANTON DN (1968) Histidine regulatory mutants in Salmonella typhimurium. V Two classes of histidine regulatory mutants. J Mol Biol 33: 533-546
- ARIAS A, GARDIOL A, MARTINEZ-DRETS G (1982) Transport and catabolism of D-Mannose in Rhizobium meliloti. J Bacteriol 151: 1069-1072
- ARIAS A, CERVENANSKY C, GARDIOL A, MARTINEZ-DRETS G (1979) Phosphoglucose isomerase mutant of Rhizobium meliloti. J Bacteriol 137: 409-414
- ATKINS GJ, HAYES AH (1972) Surface changes in a strain of Rhizobium trifolii on mutation to bacteriophage resistance. J Gen Microbiol 73: 273-278
- BACHMANN BJ (1983) Linkage map of Escherichia coli K-12 Edition 7. Microbiol Rev 47: 180-230
- BADENOCH-JONES J, SUMMONS RE, DJORDJEVIC MA, SHINE J, LETHAM DS,

sis in Aspergillus nidulans. Genetics 57: 561-570

BLASI F, ALOJ SM, GOLDBERGER RF (1971) Effect of histidine on the enzyme which catalyzes the first step of histidine biosynthesis in Salmonella typhimurium. Biochemistry 10: 1409-1416

BOSSI L, CIAMPI MS, CORTESE R (1978) Characterization of a Salmonella typhimurium hisU mutant defective in tRNA precursor processing. J Bacteriol 134: 612-620

BRENCHLEY JE, INGRAHAM JL (1973) Characterization of a cold-sensitive hisW mutant of Salmonella typhimurium. J Bacteriol 114: 528-536

BRENNER M, AMES BN (1971) The histidine operon and its regulation. Metab Pathways V: 349-387

BRENNER M, AMES BN (1972) Histidine regulation in Salmonella typhimurium. IX Histidine transfer ribonucleic acid of the regulatory mutants. J Biol Chem 247: 1080-1088

BRENNER M, DELORENZO F, AMES BN (1970) Energy charge and protein synthesis: control of aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetase. J Biol Chem 245: 450-452

ROLFE BG (1982) Mass spectrometric quantification of Indole-3-acetic acid in Rhizobium culture supernatants. Relation to roots hair curling and nodule initiation. Appl Env Microbiol 44: 275-280

BAGDASARIAN M, CIESLA Z, SENDECKI W (1970) Polyribosomes of the histidine operon in Salmonella typhimurium. J Mol Biol 48: 53-65

BALASSA R (1960) Transformation of a strain of Rhizobium lupini. Nature 188: 246-247

BALASSA G (1963) Genetic transformation of Rhizobium: A review of the work of a R. Balassa. Bacteriol Rev 27: 228-243

BALASSA R, GABOR M (1961) Transformation in nodule bacteria. Mikrobiologia 30: 457-460

BANFALVI Z, RANDHAWA GS, KONDOROSI E, KISS A, KONDOROSI A (1983) Construction and characterization of R-prime plasmids carrying symbiotic genes of Rhizobium meliloti. Mol Gen Genet 189: 129-135

BANFALVI Z, SAHANYAN V, KONCZ C, KISS A, DUSHA I, KONDOROSI A (1981) Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of Rhizobium

meliloti. Mol Gen Genet 184: 318-325

BERG DE, WEISS A, CROSSLAND L (1980) Polarity of Tn5 insertion mutations in Escherichia coli. J Bacteriol 142: 439-446

BERINGER JE (1974) R Factor transfer in Rhizobium leguminosarum. J Gen Microbiol 84: 188-198

BERINGER JE, HOPWOOD DA (1976) Chromosomal recombination and mapping in Rhizobium leguminosarum. Nature 264: 291-294

BERINGER JE, JOHNSTON AWB, WELLS B (1977) The isolation of conditional ineffective mutants of Rhizobium leguminosarum. J Gen Microbiol 98: 339-343

BERINGER JE, HOGGAN SA, JOHNSTON AWB (1978) Linkage mapping in Rhizobium leguminosarum by means of R Plasmid-mediated recombination. J Gen Microbiol 104: 201-207

BERINGER JE, JOHNSTON AWB, KONDOROSI A (1982) Genetic maps of Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti, Rhizobium phaseoli and Rhizobium trifolii. Genetic Maps Vol 2
Edit S.J. O'Brien

BERLYN MB (1967) Gene-enzyme relationships in histidine biosynthe-

BRENNER M, LEWIS JA, STRAUS DS, DELORENZO F, AMES BN (1972) Histidine regulation in Salmonella typhimurium. XIV Interaction of the histidyl transfer ribonucleic acid synthetase with histidine transfer ribonucleic acid. J Biol Chem 247: 4333-4339

BREWIN NJ, BERINGER JE, JOHNSTON AWB (1980a) Plasmid mediated transfer of host-range specific between two strains of Rhizobium leguminosarum. J Gen Microbiol 120: 413-420

BREWIN NJ, BERINGER JE, BUCHANAN-WOLLASTON AV, JOHNSTON AWB, HIRSCH PR (1980b) Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in Rhizobium leguminosarum. J Gen Microbiol 116: 261-270

BREWIN NJ, WOOD EA, JOHNSTON AWB, DIBB NJ, HOMBRECHER G (1982) Recombinant nodulation plasmids in Rhizobium leguminosarum. J Gen Microbiol 128: 1817-1827

BUCHANAN-WOLLASTON V (1979) Generalized transduction in Rhizobium leguminosarum. J Gen Microbiol 112: 135-142

BUCHANAN-WOLLASTON AV, BERINGER JE, BREWIN NJ, HIRSCH PR, JOHNSTON AWB (1980) Isolation of symbiotically defective mutants in Rhizobium leguminosarum by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. Mol Gen Genet

178: 185-190

CARLSON RW, LEE R-L (1983) A comparison of the surface polysaccharides from Rhizobium leguminosarum 128C53 sm^R rif^R with the surface polysaccharides from its Exo⁻¹ mutant¹.
Plant Physiol 71: 223-228

CASADESUS J, OLIVARES J (1979) Rough and fine linkage mapping of the Rhizobium meliloti chromosome. Mol Gen Genet 174:
203-209

CATCHESIDE DG (1965) Multiple enzymic functions of a gene in Neurospora crassa. Biochem Biophys Res Commun 18:648-651

CAVIEDES MA, MEGIAS M, GIL AM, PALOMARES AJ, RUIZ-BERRAQUERO F
(1982) Correlation between extracellular polysaccharide composition and nodulating ability in Rhizobium trifolii. Arch Microbiol 133: 20-22

CHANG GW, ROTH JR, AMES BN (1971) Histidine regulation in Salmonella typhimurium. VII Mutations of the hisT gene. J Bacteriol 108: 410-414

CHAPMAN LF, NESTER EW (1969) Gene-enzyme relationships in histidine biosynthesis in Bacillus subtilis. J Bacteriol 97:
1444-1448

- COLE MA, ELKAN GH (1979) Multiple antibiotic resistance in Rhizobium japonicum. Appl Env Microbiol 37: 867-870
- DAVIS L, WILLIAMS LS (1982) Characterization of a cold-sensitive hisW mutant of Salmonella typhimurium. J Bacteriol 151: 867-878
- DEJONG TM, BREWIN NJ, JOHNSTON AWB, PHILLIPS DA (1982) Improvement of symbiotic properties in Rhizobium leguminosarum by plasmid transfer. J Gen Microbiol 128: 1829-1838
- DELORENZO F, STRAUS DS, AMES BN (1972) Histidine regulation in Salmonella typhimurium. X Kinetic studies of mutant his tidyl transfer ribonucleic acid synthetases. J Biol Chem 247: 2302-2307
- DEMEREK M, HARTMAN Z, HARTMAN PE, YURA T, GOTS JS, OZEKI H, GLOVER SW (1956) Genetic studies with bacteria. Carnegie Inst Wash Publ 612: 136 pp
- DEMEREK M, ADELBERG EA, CLARK AJ, HARTMAN PE (1966) A proposal for uniform nomenclature in Bacterial Genetics. Genetics 54: 61-76
- DENARIE J, BERGERON B (1975) Association entre besoins nutritionnels et propriétés symbiotiques chez des mutants auxo-

phes de Rhizobium meliloti. Can J Microbiol 21: 1-13

DENARIE J, TRUCHET G, BERGERON B (1975) Effects of some mutations on symbiotic properties of Rhizobium. In: Nutman PS (ed) Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press, Cambridge, pp 47-61

DJORDJEVIC MA, ZURKOWSKI W, ROLFE BG (1982) Plasmids and stability of symbiotic properties of Rhizobium trifolii. J Bacteriol 151: 560-568

DOCTOR F, MODI VV (1976) Genetic mapping of leucine and isoleucine-valine loci in Rhizobium japonicum. J Bacteriol 126: 997-998

DOWNIE JA, MA Q-S, KNIGHT CD, HOMBRECHER G, JOHNSTON AWB (1983) Cloning of the symbiotic region of Rhizobium leguminosarum: the nodulation genes are between the nitrogenase genes and a nifA-like gene. EMBO Journal 2 (6): 947-952

DREVON JJ, FRAZIER L, RUSSELL SA, EVANS HJ (1982) Respiratory and nitrogenase activities of soybean nodules formed by hydrogen uptake negative (Hup^-) mutant and revertant strain of Rhizobium japonicum characterized by protein

patterns. *Plant Physiol* 70: 1341-1346

DUNCAN MJ (1981) Properties of Tn5 induced carbohydrate mutants in

Rhizobium trifolii. *J Gen Microbiol* 122: 61-67

DUNCAN MJ, FRAENKEL DG (1979) α -Ketoglutarate dehydrogenase mutant

of Rhizobium meliloti. *J Bacteriol* 137: 415-419

ELMERICH C, DREYFUS BL, REYSSET G, AUBERT J-P (1982) Genetic analy

sis of nitrogen fixation in a tropical fast-growing

Rhizobium. *EMBO Journal* 1 (4): 499-503

ELMOKADEM MT, KEISTER DL (1981) Mutants of Rhizobium japonicum de-

ficient in cytochromes c and aa₃. Studies with aerobi-

cally grown cells. Proceedinds of the 8th North Ameri-

can Rhizobium Conference pp 201-221

FERNANDEZ VM, MARTIN DEL RIO R, TEBAR AR, GUISAN JM, BALLESTEROS AO

(1975) Derepression and repression of the histidine

operon: role of the feedback site of the first enzyme.

J Bacteriol 124: 1366-1373

FINAN TM, WOOD JM, JORDAN (1981) Succinate transport in Rhizobium

leguminosarum. *J Bacteriol* 148: 193-202

FINAN TM, WOOD JM, JORDAN DC (1983) Symbiotic properties of C₄-Di-

carboxylic acid transport mutants of Rhizobium legumi-
nosarum. J Bacteriol 154: 1403-1413

FINK GP (1964) Gene enzyme relations in histidine biosynthesis in
yeast. Science 146: 525-527

FINK GP (1966) A cluster of genes controlling three enzymes in his-
tidine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. Gene-
tics 53: 445-459

FINK GP, ROTH JR (1968) Histidine regulatory mutants in Salmonella
typhimurium. VI Dominance studies. J Mol Biol 33:
547-557

FINK GP, KLOPOTOWSKI T, AMES BN (1967) Histidine regulatory mutants
of Salmonella typhimurium. IV A positive selection for
polar histidine-requiring mutants from histidine opera-
tor constitutive mutants. J Mol Biol 30: 81-95

FORRAI T, VINCZE E, BANFALVI Z, KISS GB, RANDHAWA GS, KONDOROSI A
(1983) Localization of symbiotic mutations in Rhizobium
meliloti. J Bacteriol 153: 635-643

GARDIOL A, ARIAS A, CERVENANSKY C, MARTINEZ-DRETS G (1982) Succina-
te-dehydrogenase mutant of Rhizobium meliloti. J Bacte-
riol 151: 1621-1623

- GARRICK-SILVERSMITH L, HARTMAN PE (1970) Histidine requiring mutants of Escherichia coli K-12. *Genetics* 66: 231-244
- GLENN AR, BREWIN NJ (1981) Succinate-resistant mutants of Rhizobium leguminosarum. *J Gen Microbiol* 126: 237-241
- GOMORI G (1955) Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology* Acad Press (New York) 1: 138-146
- GREEB J, ATKINS JF, LOPER JC (1971) Histidinol dehydrogenase (hisD) of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* 106: 421-431
- HARTMAN PE, HARTMAN Z, SERMAN D (1960a) Complementation mapping by abortive transduction of histidine-requiring Salmonella mutants. *J Gen Microbiol* 22: 354-368
- HARTMAN PE, LOPER JC, SERMAN D (1960b) Fine structure mapping by complete transduction between histidine-requiring Salmonella mutants. *J Gen Microbiol* 22: 323-353
- HARTMAN PE, HARTMAN Z, STAHL RC, AMES BN (1971) Classification and mapping of spontaneous and induced mutations in the histidine operon of Salmonella. *Adv Genet* 17: 1-34
- HAUGLAND RA, HANUS FJ, CANTRELL MA, EVANS HJ (1983) Rapid colony screening method for identifying hydrogenase activity

in Rhizobium japonicum. Appl Env Microbiol 45: 892-897

HEUMANN W (1968) Conjugation in starforming Rhizobium lupini. Mol Gen Genet 102: 132-144

HEUMANN W (1979) Rhizobium lupini genetics. Curr Topics in Microbiol and Immunol 88: 1-23

HIRSCH AM, LONG SR, BANG M, HASKINS N, AUSUBEL FM (1982) Structural studies of alfalfa roots infected with nodulation mutants of Rhizobium meliloti. J Bacteriol 151: 411-419

HOOYKAAS PJJ, KLAPWIJK PM, NUTI MP, SCHILPEROORT RA, RÖRSCH A (1977) Transfer of a Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to Rhizobium ex plan ta. J Gen Microbiol 93: 447-484

HOOYKAAS PJJ, PEERBOLTE R, REGENSBURG-TUINK AJG, de VRIES P, SCHILPEROORT RA (1982) A chromosomal linkage map of Agrobacterium tumefaciens and a comparison with the maps of Rhizobium spp. Mol Gen Genet 188: 12-17

HOPPE I, JOHNSTON HM, BIEK D, ROTH JR (1979) A refined map of the hisG gene of Salmonella typhimurium. Genetics 92: 17-26

JACOB F, MONOD J (1961) Genetic regulatory mechanism in the synthe

sis of proteins. J Mol Biol 3: 318-356

- JACOB AE, CRESSWELL JM, HEDGES RW, COETZEE JN, BERINGER JE (1976)
Properties of plasmid constructed by the in vitro insertion of DNA from Rhizobium leguminosarum or Proteus mirabilis into RP4. Mol Gen Genet 147: 315-323
- JESSBERGER B, PUHLER A, HEUMANN W (1974) Sequentielle mutagenese in Rhizobium lupini. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A 228: 162-167
- JOHNSTON AWB, BERINGER JE (1975) Identification of the Rhizobium strains in pea root nodules using genetic markers. J Gen Microbiol 87: 343-350
- JOHNSTON HM, ROTH JR (1979) Histidine mutants requiring adenine: selection of mutants with reduced hisG expression in Salmonella typhimurium. Genetics 92: 1-15
- JOHNSTON AWB, SETCHELL SM, BERINGER JE (1978a) Interspecific crosses between Rhizobium leguminosarum and Rhizobium meliloti: formation of haploid recombinants and of R-primers. J Gen Microbiol 104: 209-218
- JOHNSTON AWB, BIBB MJ, BERINGER JE (1978b) Tryptophan genes in Rhizobium: their organization and their transfer to

other bacterial genera. *Mol Gen Genet* 165: 323-330

JOHNSTON AWB, HOMBRECHER G, BREWIN NJ, COOPER MC (1982) Two transmissible plasmids in Rhizobium leguminosarum strain 300. *J Gen Microbiol* 128: 85-93

JOHNSTON AWB, BERINGER JE, BEYNON JL, BREWIN NJ, BUCHANAN-WOLLASTON AV, HIRSCH PR (1979) Plasmids and the Rhizobium-legume symbiosis. P M C E I, K.N.Timmis & A.Pühler (ed) pp 317-325

JORDAN DC, YAMAMURA Y, MCKAGUE ME (1969) Mode of action of viomycin on Rhizobium meliloti. *Can J Microbiol* 15: 1005-1012

JULLIOT JS, BOISTARD P (1979) Use of RP4-prime plasmids constructed in vitro to promote a polarized transfer of the chromosome in Escherichia coli and Rhizobium meliloti. *Mol Gen Genet* 173: 289-298

KANE-FALCE C, KLOOS WE (1975) A genetic and biochemical study of histidine biosynthesis in Micrococcus luteus. *Genetics* 79: 361-376

KAUSHIK BD, VENKATARAMAN GS (1972) Induced variations in microorganisms. III Genetic transfer between intact cells of the mutants of Rhizobium trifolii. *Folia Microbiologi-*

ca 17: 393-395

KISS GB, VINCZE E, KALMAN Z, FORRAI T, KONDOROSI A (1979) Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in Rhizobium meliloti. J Gen Microbiol 113: 105-118

KISS GB, DOBO K, DUSHA I, BREZNOVITS A, OROSZ L, VINCZE E, KONDOROSI A (1980) Isolation and characterization of a R-prime plasmid from Rhizobium meliloti. J Bacteriol 141: 121-128

KLOOS WE, PATTEE PA (1965a) A biochemical characterization of a histidine-dependent mutants of Staphylococcus aureus. J Gen Microbiol 39: 185-194

KLOOS WE, PATTEE PA (1965b) Transduction analysis of the histidine region in Staphylococcus aureus. J Gen Microbiol 39: 195-207

KONDOROSI A, OROSZ L, SVAB Z, SIK T (1974) Genetic studies on Rhizobiophage 16-3. II Helper-induced transfection. Mol Gen Genet 132: 153-163

KONDOROSI A, SVAB Z, KISS GB, DIXON RA (1977) Ammonia assimilation and nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. Mol Gen

Genet 151: 221-226

KONDOROSI A, VINCZE E, JOHNSTON AWB, BERINGER JE (1980) A comparison of three Rhizobium linkage maps. Mol Gen Genet 178: 403-408

KONDOROSI A, KONDOROSI E, PANKHURST CE, BROUGHTON WJ, BANFALVI Z (1982) Mobilization of a Rhizobium meliloti megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other Rhizobia and Agrobacterium. Mol Gen Genet 188: 433-439

KOWALSKI M (1971) Transduction in Rhizobium meliloti. Plant and Soil, Special Volume 63-66

KOWALSKI M, DENARIE J (1972) Transduction d'un gène contrôlant l'expression de la fixation de l'azote chez Rhizobium meliloti. C R Acad Sci Paris Ser D 275: 141-144

KOWALCZUK E, LORKIEWICZ Z (1977) Transfer of R1drd19 plasmid from Escherichia coli J53 to Rhizobium trifolii by conjugation. Acta Microbiologica Polonica 26: 9-18

KRAJEWSKA-GRYNKIEWICZ K, WALCZAK W, KLOPOTOWSKI T (1971) Mutants of Salmonella typhimurium able to utilize D-histidine as a source of L-histidine. J Bacteriol 105: 28-37

- KROL AJM, HONTELEZ JGJ, ROOZENDAAL B, VAN KAMMEN A (1982) On the operon structure of the nitrogenase genes of Rhizobium leguminosarum and Azotobacter vinelandii. Nucl Acid Res 10: 4147-4158
- KUSTU SG, AMES GF (1973) The hisP protein, a known histidine transport component in Salmonella typhimurium, is also an arginine transport component. J Bacteriol 116: 107-113
- KUSTU SG, MCKEREGHAN K (1975) Mutations affecting glutamine synthetase activity in Salmonella typhimurium. J Bacteriol 122: 1006-1016
- KUYKENDALL LD (1981) Mutants of Rhizobium that are altered in legume interaction and nitrogen fixation. International Review of Cytology, Supplement 13 pp 299-309
- KUYKENDALL LD, ELKAN GH (1976) Rhizobium japonicum derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. Appl Env Microbiol 32: 511-519
- LAW IJ, YAMAMOTO Y, MORT AJ, BAUER (1982) Nodulation of soybean by Rhizobium japonicum mutants with altered capsule synthesis. Planta 154: 100-109
- LAWTHER RP, HATFIELD GW (1977) Biochemical characterization of an

Escherichia coli hisT strain. J Bacteriol 130: 552-557

LEDERBERG J, CAVALLI LL, LEDERBERG EM (1952) Sex compatibility in Escherichia coli. Genetics 37: 720-730

LEPO JE, HICKOT RE, CANTRELL MA, RUSSELL SA, EVANS HJ (1981) Reversible hydrogen uptake-deficient mutants of Rhizobium japonicum. J Bacteriol 146: 614-620

LEVIN RA, MONTGOMERY MP (1974) Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of Rhizobium japonicum. Plant and Soil 41: 669-676

LOPER JC (1968) Histidinol dehydrogenase from Salmonella typhimurium: crystallization and composition studies. J Biol Chem 243: 3264-3272

LOPER JC, GRABNER M, STAHL RC, HARTMAN Z, HARTMAN PE (1964) Genes and proteins involved in histidine biosynthesis in Salmonella. Brookhaven Symp Biol 17: 15-52

LORKIEWICZ Z, MELKE A (1970) Infectiveness of the histidine-dependent mutants of Rhizobium trifolii. Acta Microbiologica Polonica Ser A 2: 75-77

LORKIEWICZ Z, RUSSA R (1971) Immunochemical studies of Rhizobium

mutants. Plant and Soil, Special Volume 105-109

LORKIEWICZ Z, ZURKOWSKI W, KOWALCZUK E, GORSKA-MELKE A (1971) Mutation
genesis and conjugation in Rhizobium trifolii. Acta
Microbiologica Polonica Ser A 3: 101-108

LUDWIG RA, SIGNER ER (1977) Glutamine synthetase and control of nitrogen
fixation in Rhizobium. Nature (London) 267:
245-247

MA Q-S, JOHNSTON AWB, HOMBRECHER G, DOWNIE JA (1982) Molecular genetics
of mutants of Rhizobium leguminosarum which
fail to fix nitrogen. Mol Gen Genet 187: 166-171

MACKENZIE CR, JORDAN DC (1972) Cell-wall composition and viomycin
resistance in Rhizobium meliloti. Can J Microbiol 18:
1168-1170

MACKENZIE CR, JORDAN DC (1974) Ultrastructure of root nodules formed
by ineffective strains of Rhizobium meliloti. Can
J Microbiol 20: 755-758

MAIER RJ, BRILL WJ (1976) Ineffective and non-nodulating mutants
strains of Rhizobium japonicum. J Bacteriol 127:
763-769

- MAIER RJ, BRILL WJ (1978) Involvement of Rhizobium japonicum O antigen in soybean nodulation. *J Bacteriol* 133: 1295-1299
- MAIER RJ, MUTAFTSHIEV S (1982) Reconstitution of H₂ oxidation activity from H₂ uptake-negative mutants of Rhizobium japonicum bacteroids. *J Biol Chem* 257: 2092-2096
- MAIER RJ, BISHOP PE, BRILL WJ (1978) Transfer from Rhizobium japonicum to Azotobacter vinelandii of genes required for nodulation. *J Bacteriol* 134: 1199-1201
- MARTIN RG (1963) The one operon-one messenger theory of transcription. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 28: 357-361
- MARTIN RG, BERBERICH MA, AMES BN, DAVIS WW, GOLDBERGER RF, YOURNO JD (1970) Enzymes and intermediates of histidine biosynthesis in Salmonella typhimurium. *Methods of Enzymology* 17 (B): 3-44
- MATERON LA, HAGEDORN C (1982) Competitiveness of Rhizobium trifolii strains associated with red clover (Trifolium pratense L) in Mississippi soils. *Appl Env Microbiol* 44: 1096-1101
- MEADE HM, SIGNER ER (1977) Genetic mapping of Rhizobium meliloti using RP4. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 2076-2078

MEADE HM, LONG SR, RUVKUN GB, BROWN SE, AUSUBEL SM (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti induced by transposon Tn5 mutagenesis. J Bacteriol 149: 114-122

MEE BJ, LEE BTO (1967) An analysis of histidine requiring in Pseudomonas aeruginosa. Genetics 55: 709-722

MEGIAS M, CAVIEDES MA, ROMERO P, PALOMARES AJ (1981) Potential of plasmids RP1, RP4, R1drd19 and R68.45 for conjugal transfer and chromosome mobilization in Rhizobium trifolii. Microbios Letters 17: 17-22

MEGIAS M, CAVIEDES MA, PALOMARES AJ, PEREZ-SILVA J (1982) Use of plasmid R68.45 for constructing a circular linkage map of the Rhizobium trifolii chromosome. J Bacteriol 149: 59-64

MISHRA AK, ROY P, DAS SK (1975) Occurrence of streptomycin resistant and dependent mutations in Rhizobium lupini under the influence of nitrous acid. Curr Sci 44: 267-269

MOYED HS, MAGASANIK BJ (1960) The biosynthesis of the imidazole ring of histidine. J Biol Chem 235: 149-153

NAPOLI C, ALBERSHEIM A (1980) Rhizobium leguminosarum mutants inca

pable of normal extracellular polysaccharide production. *J Bacteriol* 141: 1451-1456

NELSON LM, SALMINEN SO (1982) Uptake hydrogenase activity and ATP formation in Rhizobium leguminosarum bacteroids. *J Bacteriol* 151: 989-995

NIKAIDO H, LEVINTHAL M, NIKAIDO K, NAKANE K (1967) Extended deletions in the histidine-rough-B region of the Salmonella chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 57: 1825-1832

NOEL KD, STACEY G, TANDON SR, SILVER LE, BRILL WJ (1982) Rhizobium japonicum mutants defective in symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* 152: 485-494

NOVICK RP, CLOWES RC, COHEN SN, CURTIS III R, DATTA N, FALKOW S (1976) Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* 40: 168-189

OESCHGER NS, HARTMAN PE (1970) ICR-induced frameshift mutations in the histidine operon of Salmonella. *J Bacteriol* 101: 490-504

O'GARA F, SHANMUGAM KT (1977) Regulation of nitrogen fixation in Rhizobium spp. Isolation of mutants of Rhizobium trifolii which induce nitrogenase activity. *Biochem Biophys*

Acta 500: 277-290

O'GARA F, CASEY C, BOLTON E (1981) Introduction and behaviour of transposons in Rhizobium spp. Proceedings of the 8th North American Rhizobium Conference pp 15-33

OSBURNE MS (1982) Rhizobium meliloti mutants altered in ammonium utilization. J Bacteriol 151: 1633-1636

PAIN AN (1979) Symbiotic properties of antibiotic-resistant auxotrophic mutants of Rhizobium leguminosarum. J Appl Bacteriol 47: 53-64

PANKHURST CE (1974) Ineffective Rhizobium trifolii mutants examined by immunodiffusion, gel-electrophoresis and electron microscopy. J Gen Microbiol 82: 405-413

PANKHURST CE, CRAIG AS (1979) Morphology and nitrogenase activity of agar cultures and root nodules formed by D-cycloserine-resistant mutants of Rhizobium sp. strain 32H1. J Gen Microbiol 110: 177-184

PANKHURST CE, SCHWINGHAMER EA (1974) Adenine requirement for nodulation of pea by an auxotrophic mutant of Rhizobium leguminosarum. Arch Microbiol 100: 219-238

- PANKHURST CE, SCOTT DB, RONSON CW (1982) Correlation between rifampicin-resistance of slow-growing Rhizobium strains and their ability to express nitrogenase activity in culture. FEMS Microbiol Letters 15: 137-139
- PARKER J (1982) Specific mistranslation in hisT mutants of Escherichia coli. Mol Gen Genet 187: 405-409
- PARKER J, FISHMAN SE (1979) Mapping hisS, the structural gene for histidyl-transfer ribonucleic acid synthetase, in Escherichia coli. J Bacteriol 138: 264-267
- PARSONS SM, KOSHLAND DE (1974) A rapid isolation of phosphoribosyl adenosine triphosphate synthetase and comparison to native enzyme. J Biol Chem 249: 4104-4110
- PATEL JJ, BEHKI RM, SELVARAJ G, IYER VN (1981) Mutants of Rhizobium meliloti defective in root nodulation. Proceedings of the 8th North American Rhizobium Conference pp 129-149
- PHILLIPS DA, HOWARD RL, EVANS HJ (1973) Studies on the genetic control of a nitrogenase component in leguminous root nodules. Plant Physiol 28: 248-253
- RALEIGH EA, SIGNER ER (1982) Positive selection of nodulation-deficient Rhizobium phaseoli. J Bacteriol 151: 83-88

- RHOADES M, MACHATTIE LA, THOMAS Jr CA (1968) The P22 bacteriophage DNA molecule. I The nature form. *J Mol Biol* 37: 21-40
- ROLFE BG, GRESSHOFF PM (1980) Rhizobium trifolii mutant interaction during the establishment of nodulation in white clover. *Aust J Biol Sci* 33: 491-504
- ROLFE BG, SHINE J, GRESSHOFF PM, SCOTT KF, DJORDJEVIC M, CEN Y, HUGHES JE, BENDER GL, CHAKRAVORTY A, ZURKOWSKI W, WATSON JM, BADENOCH-JONES J, MORRISON NA, TRINICK MJ (1981) Transposon induced mutants of fast and slow-growing Rhizobia and the molecular cloning of symbiotic genes. Proceedings of the 8th North American Rhizobium Conference pp 129-149
- RONSON CW, PRIMROSE S (1979) Carbohydrate metabolism in Rhizobium meliloti: identification and symbiotic properties of mutants. *J Gen Microbiol* 112: 77-88
- RONSON CW, LITTLETON P, ROBERTSON JG (1981) C₄-dicarboxylate transport mutants of Rhizobium trifolii from ineffective nodules of Trifolium repens. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4284-4288
- ROSENFELD SA, BRECHLEY JE (1980) Regulation of nitrogen utilization in hisT mutants of Salmonella typhimurium. *J Bac-*

teriol 143: 801-808

ROTH JR, AMES BN (1966) Histidine regulatory mutants in Salmonella typhimurium. II Histidine regulatory mutants having altered histidyl-tRNA synthetase. J Mol Biol 22: 325-334

ROTH JR, HARTMAN PE (1965) Heterogeneity of P22 transducing particles. Virology 27: 297-307

ROTH JR, SANDERSON KE (1966a) Orientation of the isoleucine-valine genes in the Salmonella typhimurium linkage map. Genetics 53: 971-976

ROTH JR, ANTON DA, HARTMAN PE (1966b) Histidine regulatory mutants in Salmonella typhimurium. I Isolation and general properties. J Mol Biol 22: 305-323

ROTH JR, SILBERT DF, FINK GR, VOLL MJ, ANTON DA, HARTMAN PE, AMES BN (1966) Transfer RNA and the control of the histidine operon. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 31: 383-392

ROY P, MISHRA AK (1976) Amino acid requiring auxotrophs in Rhizobium lupini and their growth response to required metabolites. The nucleus 19: 25-29

RUSSEL PE, JONES DG (1973) The effect of ultra-violet light on the

symbiotic effectiveness and some physiological characteristics of four strains of Rhizobium trifolii. J Appl Bacteriol 36: 567-573

RUSSI S, CARERE A, KHOUDOKORMOFF V (1966) Caratterazione biochimica dé Streptomyces coelicolor richidenti istidina. Ann Ist Super Sanità 2: 506-522

SANDERS RE, CARLSON RW, ALBERSHEIM P (1978) A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. Nature 271: 240-242

SANDERS RE, RALEIGH E, SIGNER E (1981) Lack of correlation between extracellular polysaccharide and nodulation ability in Rhizobium. Nature 292: 148-149

SANDERSON KE (1970) A current linkage map of Salmonella typhimurium. Bacteriol Rev 34: 176-193

SANDERSON KE, HARTMAN PE (1978) Linkage map of Salmonella typhimurium, Edition V. Microbiol Rev 42: 471-519

SCHERRER A, DENARIE J (1971) Symbiotic properties of some auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti and of their prototrophic revertants. Plant Soil, Volumen Special 39-45

- SCHWINGHAMER EA (1964) Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strain of Rhizobium spp.
Can J Microbiol 10: 221-233
- SCHWINGHAMER EA (1967) Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation for resistance to antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology and Serology 33: 121-136
- SCHWINGHAMER EA (1968) Loss of effectiveness and infectivity in mutants of Rhizobium resistant to metabolic inhibitors.
Can J Microbiol 14: 355-367
- SCHWINGHAMER EA, DUDMAN WF (1973) Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with Rhizobium spp. J Appl Bacteriol 36: 263-272
- SCOTT DB, RONSON CW (1982) Identification and mobilization by coin-tegrate formation of a nodulation plasmid in Rhizobium trifolii. J Bacteriol 151: 36-43
- SCOTT JF, ROTH JR, ARTZ SW (1975) Regulation of histidine operon does not require hisG enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 72: 5021-5025
- SCOTT KF, HUGHES JE, GRESSHOFF PM, BERINGER JE, ROLFE BG, SHINE J

(1982) Molecular cloning of Rhizobium trifolii genes involved in symbiotic nitrogen fixation. J Mol and Appl Genetics 1: 315-326

SCOTTI MRML, SA NMH, VARGAS MAT, DOBEREINER J (1982) Streptomycin resistance of Rhizobium isolates from Brazilians Cerrados. An Acad Brasil Ciênc 54: 733-738

SHAH K, PATEL C, MODI VV (1983) Linkage mapping of Rhizobium japonicum D211 by phage M-1 mediated transduction. Can J Microbiol 29: 33-38

SIK T, HORVATH J, CHATTERJEE S (1980) Generalized transduction in Rhizobium meliloti. Mol Gen Genet 178: 511-516

SILBERT DF, FINK GR, AMES BN (1966) Histidine regulatory mutants in Salmonella typhimurium. III A class of regulatory mutants deficient in tRNA for histidine. J Mol Biol 22: 335-347

SIMON R, WEBER G, ARNOLD W, PUHLER A (1981) Analysis of plasmid borne genes in Rhizobium meliloti by Tn5 mutagenesis. Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, FRG

SKOTNICKI ML, ROLFE BG (1979) Bacterial and bacteroid properties of mutants of Rhizobium trifolii strain T1 uncoupled in

oxidative phosphorylation. Aust J Biol Sci 32: 501-517

SKOTNICKI ML, ROLFE BG, REPORTER M (1979) Nitrogenase activity in pure cultures of spectinomycin-resistant. Biochem Biophys Res Commun 86: 968-975

STANIEWSKI R, JURZYK I, LORKIEWICZ Z (1973) Typing of Rhizobium trifolii mutants by means of phages. Acta Microbiologica Polonica 5: 21-25

STANLEY J, DUNICAN LK (1979) Intergeneric mobilization of Rhizobium nif genes to Agrobacterium and Klebsiella. Mol Gen Genet 174: 211-220

SVAB Z, KONDOROSI A, OROSZ L (1978) Specialized transduction of a cysteine marker by Rhizobium meliloti phage 16-3. J Gen Microbiol 106: 321-327

TANEMURA S, YOURNO J (1969) Frameshift revertant of Salmonella typhimurium producing histidinol dehydrogenase with a sequence of four extra amino acid residues. J Mol Biol 46: 459-466

TRUCHET G, DENARIE J (1973) Structure et activité réductrice d'acétylène des nodules de Lucerne (Medicago sativa L) induits par des mutants de Rhizobium meliloti auxotrophes

pour l'adenine et pour l'uracile. C R Acad Sci Paris
Ser D 277: 841-844

TRUCHET G, MICHEL M, DENARIE J (1980) Use of leucine requiring mutants of Rhizobium meliloti for the study of Lucerne root-nodule formation. Differentiation 16: 163-172

UMBARGER HE (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. Annu Rev Biochem 47: 533-606

WAINSCOTT VJ, FERRETTI JJ (1978) Biochemical-genetic study of the first enzyme of the histidine biosynthesis in Salmone-lla typhimurium: substrate and feedback binding regions. J Bacteriol 133: 114-121

WALTON DA, MOSELEY BEB (1981a) Induced mutagenesis in Rhizobium trifolii. J Gen Microbiol 124: 191-195

WALTON DA, MOSELEY BEB (1981b) Isolation and properties of an ultra violet-sensitive mutant of Rhizobium trifolii. J Gen Microbiol 124: 197-201

WHITFIELD Jr HJ (1971) Purification and properties of the wild type and a feedback-resistant phosphoribosyladenosine triphosphate. J Biol Chem 246: 899-908

- WINKLER ME, ROTH DJ, HARTMAN PE (1978) Promoter and attenuator related metabolic regulation of the Salmonella typhimurium histidine operon. J Bacteriol 133: 830-843
- WYCHE JH, ELY B, CEBULA TA, SNEAD MC, HARTMAN PE (1974) Histidyl-transfer ribonucleic acid synthetase in positive control of the histidine operon in Salmonella typhimurium. J Bacteriol 117: 708-716
- YOURNO J (1968) Composition and subunit structure of histidinol dehydrogenase from Salmonella typhimurium. J Biol Chem 243: 3277-3288
- ZAJAC E, RUSSA R, LORKIEWICZ Z (1975) Lipopolysaccharide as receptor for Rhizobium phage 1P. J Gen Microbiol 90: 365-367
- ZELAZNA I (1963) Transformation in Rhizobium. Acta Microbiologica Polonica Ser A 12: 166-178
- ZELAZNA I (1964) Transformation in Rhizobium trifolii. II Development of competence. Acta Microbiologica Polonica Ser A 13: 291-298
- ZELAZNA-KOWALSKA I (1977) [³H]dihydrostreptomycin accumulation and binding to ribosomes in Rhizobium mutants with different levels of streptomycin resistance. J Bacteriol

132: 8-12

ZELAZNA-KOWALSKA I, LORKIEWICZ Z (1971) Transformation in Rhizobium trifolii. IV Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in Rhizobium trifolii. Acta Microbiologica Polonica Ser A III (XX): 21-26

ZELAZNA-KOWALSKA I, KOWALSKI M (1978) Restoration of effectiveness of Rhizobium meliloti ineffective mutants by transduction of high level streptomycin resistance. Acta Microbiologica Polonica 27: 339-345

ZELAZNA-KOWALSKA I, ZURKOWSKI W, LORKIEWICZ Z, MENZIES JD (1974) Transformation of effectiveness in Rhizobium japonicum. Acta Microbiologica Polonica Ser A 6: 269-274

ZINDER ND, LEDERBERG J (1952) Genetic exchange in Salmonella. J Bacteriol 64: 679-699

ZURKOWSKI W (1982) Molecular mechanism for loss of nodulation properties of Rhizobium trifolii. J Bacteriol 150: 999-1007

ZURKOWSKI W, LORKIEWICZ Z (1977) Bidirectional replication of the chromosome in Rhizobium trifolii. Mol Gen Genet 156: 215-219

ZURKOWSKI W, LORKIEWICZ Z (1978a) Genetic mapping of the chromosome of Rhizobium trifolii. Acta Microbiologica Polonica 27 (4): 309-310

ZURKOWSKI W, LORKIEWICZ Z (1978b) Effective method for the isolation of non-nodulating mutants of Rhizobium trifolii. Genet Res Camb 32: 311-314

ZURKOWSKI W, LORKIEWICZ Z (1979) Plasmid-mediated control of nodulation in Rhizobium trifolii. Arch Microbiol 123: 195-201