



## Genética y Regulación del Metabolismo Nitrogenado en *Azospirillum*

MIGUEL VELÁZQUEZ<sup>1\*</sup> Y ANA N. HERNÁNDEZ<sup>2</sup>

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Carretera Yautepec-Jojutla. Km. 8.5 Col. San Isidro Yautepec, Morelos, México. C. P. 62731.<sup>1</sup>

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Carretera Tapaste Km. 3 San José de las Lajas, La Habana, Cuba. C. P. 32700.<sup>2</sup>

\*Autor para la correspondencia: Tel. (739) 4 20 20. Fax (739) 4 18 96. E-mail: [mdelvall@redipn.ipn.mx](mailto:mdelvall@redipn.ipn.mx).

**ABSTRACT.** The genus *Azospirillum* is classified within the group of plant growth promoting bacteria. The contribution of this bacterium on plant growth through nitrogen fixation has been speculated. That is why various researches have been undertaken to know more about the genetic basis of this process. With the advances obtained on *Klebsiella pneumoniae*, a better comprehension of the regulation and organization of the genes *nif* in others nitrogen fixers has been achieved. Several key regulatory and structural genes involving in nitrogen metabolism have been isolated and characterized in *Azospirillum*, including *nifHDK*, *nifA*, *ntfBC*, *glnA*, *glnB* and *rpoN*. This work revises the genetics and regulation of the nitrogen metabolism in *Azospirillum*.

**Key words:** *Azospirillum*, *Klebsiella pneumoniae*, Nitrogen Metabolism.

**RESUMEN.** El género *Azospirillum* está considerado dentro de la clasificación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Se ha especulado con relación a la contribución que ejerce esta bacteria al desarrollo vegetal a través de la fijación de nitrógeno por lo que conocer las bases genéticas de este proceso ha sido objeto de diversas investigaciones. Con los avances obtenidos en *K. pneumoniae* se ha comprendido mejor la regulación y organización de los genes *nif* en otros microorganismos fijadores de nitrógeno. Se ha logrado el aislamiento y caracterización de varios genes estructurales y regulatorios involucrados en el metabolismo nitrogenado de *Azospirillum*, tales como *nifHDK*, *nifA*, *ntfBC*, *glnA*, *glnB* y *rpoN*. En este trabajo se revisa la genética y regulación del metabolismo nitrogenado en *Azospirillum*.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, *Klebsiella pneumoniae*, Metabolismo Nitrogenado.

### INTRODUCCIÓN

El género *Azospirillum* está constituido por 5 especies: *A. brasilense*,<sup>29</sup> *A. lipoferum*,<sup>29</sup> *A. amazonense*,<sup>16</sup> *A. Halopraeferans*<sup>24</sup> y *A. Irakense*.<sup>13</sup> Se considera una bacteria fijadora de nitrógeno cuya distribución en los suelos es cosmopolita, se puede encontrar asociada a raíces de plantas mono y dicotiledoneas. Un estudio<sup>2</sup> realizado con el propósito de dividir las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en dos clasificaciones: biocontrol-bacterias promotoras del crecimiento vegetal y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, evidencia que *Azospirillum* sea considerado como candidato ideal para incluirse en la última clasificación.

En ensayos realizados en condiciones de campo, la inoculación<sup>20</sup> de plantas con *Azospirillum* ha producido incrementos en el rendimiento de forrajes y granos entre el 15-20% en promedio en comparación con plantas no inoculadas. Sin embargo, también se ha observado inconsistencia en la obtención de respuestas positivas y una de las principales causas podría ser que la contribución de la fijación de nitrógeno para el desarrollo vegetal sea mucho más baja de

lo que previamente se había considerado.<sup>21</sup>

El nitrógeno total fijado por este género bacteriano asociado a raíces ha sido valorado como limitado, esto podría deberse a que esta bacteria de manera semejante a otras fijadoras libres de nitrógeno, reprime fácilmente su nitrogenasa y normalmente no libera el nitrógeno fijado al medio ambiente.<sup>4</sup> Es conveniente realizar mayores esfuerzos en investigación y llegar a conocer con más profundidad las bases fisiológicas y moleculares de la asociación *Azospirillum* – planta para obtener resultados consistentes.

### COMPLEJO NITROGENASA

Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentan un complejo nitrogenasa (estructuralmente muy similar) que posee la capacidad de transformar una molécula de nitrógeno a dos de amoníaco. Este complejo tiene un alto grado de conservación con propiedades muy particulares que a continuación se resumen:

- Consiste de dos componentes (Fierro-Molibdeno Proteína y Fierro-Proteína).

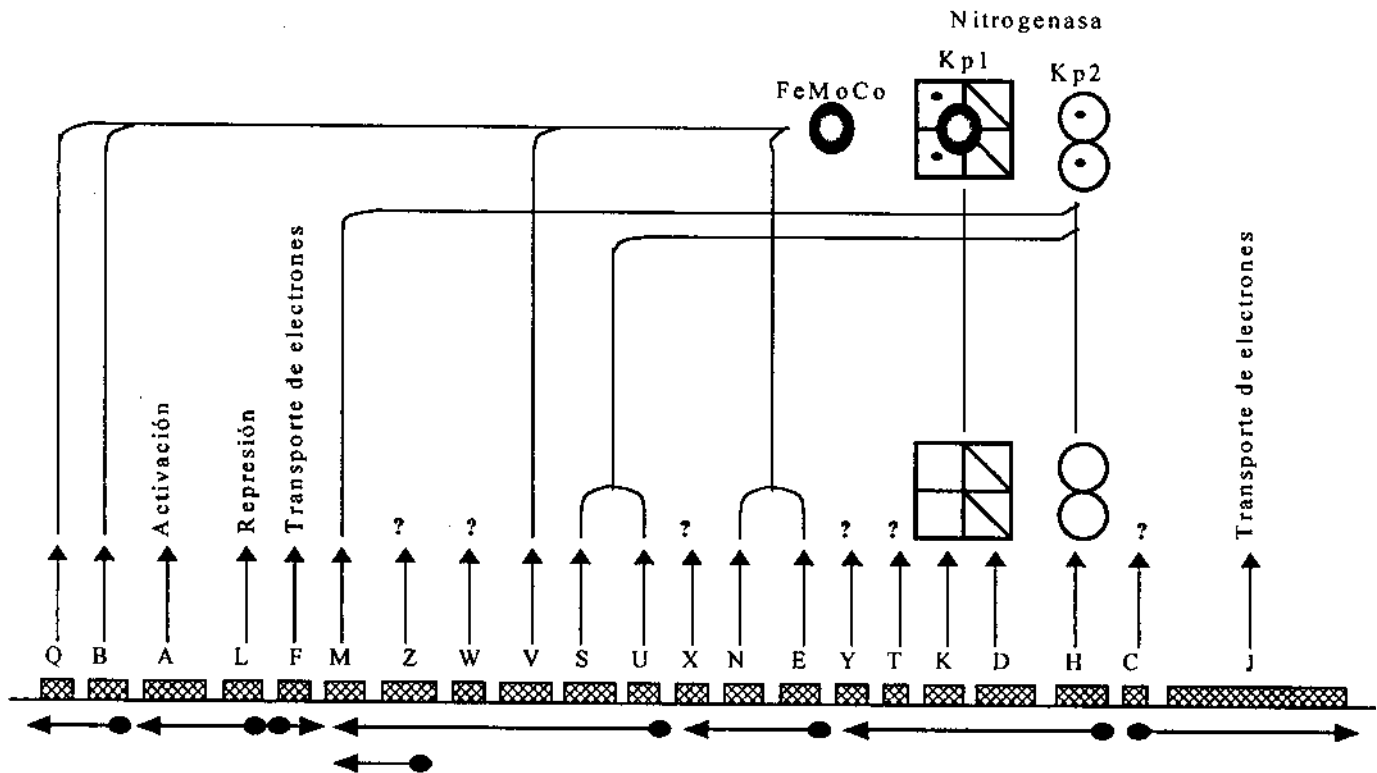


Figura 1. El regulón *nif* en *K. pneumoniae*. El papel de los productos de los genes se indica esquemáticamente por flechas verticales. Las flechas horizontales indican la dirección y la extensión de cada uno de los transcritos, con puntos negros se representa la localización de los promotores *nif*<sup>18</sup>.

- b) Reduce N<sub>2</sub> y también otras moléculas pequeñas con triple enlace.
- c) Requiere ATP para funcionar.
- d) Es inhibida por oxígeno y ADP

La nitrogenasa de *Azospirillum* está constituida por un tetrámero de 210,000 Da formado por 2 polipéptidos que son codificados por los genes *nifK* y *nifD*, además<sup>26</sup> de un dímero de 67,000 Da producto de *nifH* y se activa en bajas tensiones de oxígeno.<sup>5</sup>

Es importante resaltar que en *A. brasilense* y *A. lipoferrum* la actividad nitrogenasa está sujeta a inactivación reversible por amonio<sup>11</sup> la cual es mediada por una modificación de tipo covalente (ADP – ribosilación) del componente 2 de la nitrogenasa. Los genes que codifican para la ADP – ribosil transferasa (DRAT) y para la glicohidrolasa activadora (DRAG) han sido clonados tanto en *A. lipoferrum*<sup>9</sup> como en *A. Brasilense*.<sup>33</sup>

### GENÉTICA DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El estudio de la genética de la fijación del nitrógeno fue desarrollado inicialmente en *K. pneumoniae* y con los avances obtenidos en este microorganismo se logró com-

prender mejor la regulación y organización de los genes *nif* en otros fijadores de nitrógeno. En *K. pneumoniae*, se han descrito 21 genes *nif* específicos que están organizados en 8 unidades transcricionales dentro de una región cromosomal de 23 Kb.<sup>6</sup>

Los polipéptidos estructurales de la nitrogenasa están codificados en un operón (*nifHDK*), otras proteínas codificadas en esta región están involucradas en la biosíntesis del cofactor de hierro y molibdeno (FeMoCo) (*nifBENVQ*) y en la modificación postraduccional de la ferroproteína (*nifM*). Existe un operón regulatorio específico de la fijación (*nifAL*) (Fig. 1).

Se han utilizado como sondas plásmidos recombinantes que contienen los genes *nifHDK* de *K. pneumoniae*, en numerosos estudios de hibridación contra el DNA total de diferentes fijadores y se ha demostrado que en bacterias fijadoras (*Rhizobium*, *Azotobacter*, etc.) existe DNA que hibrida con estos genes de la nitrogenasa, lo que indica un alto grado de conservación en la estructura de esta enzima.<sup>6</sup> En muchos casos estas regiones de DNA han sido clonadas y secuenciadas.

La organización de *nifHDK* dentro de una unidad transcripcional está conservada en la mayoría de los fijadores. Sin embargo, otros genes *nif* no presentan suficiente homología como para ser localizados por medio de hibridaciones

de DNA con sondas heterólogas. Estos genes *nif* han podido ser identificados mediante mutagénesis con transposones o utilizando complementaciones de mutantes  $Nif^-$  con cósmidos.<sup>6</sup>

### REGULACIÓN DE LOS GENES *nif* EN *Klebsiella pneumoniae*

La fijación de nitrógeno es un proceso energéticamente muy costoso. La síntesis de la nitrogenasa es reprimida en presencia de una fuente de nitrógeno combinado donde la función de la enzima no es esencial para el crecimiento, o en presencia de un exceso de oxígeno cuando la nitrogenasa puede ser rápidamente inactivada.

El sistema regulatorio *nif* en *K. pneumoniae*, que es el mejor conocido hasta ahora, se describe de manera general en la Fig. 2.

El análisis de la regulación de los genes *nif* en *K. pneumoniae* ha proporcionado elementos para comprender el control transcripcional de la expresión genética de este

proceso.<sup>17</sup>

- La RNA polimerasa requiere de un factor  $\sigma^{54}$  para reconocer a los promotores *nif*.
- Las proteínas involucradas en la activación de los promotores *nif* interactúan con el DNA en sitios anteriores al punto de inicio de la transcripción.
- El control negativo se realiza modulando la actividad de las proteínas activadoras.

En esta enterobacteria la expresión de muchos genes en respuesta al balance nitrogenado es modulada por el sistema regulador global del metabolismo nitrogenado (NTR). Genéticamente este sistema comprende al gen *ntrA*, el cual codifica para el factor  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa, el gen *ntrC*, que codifica para una proteína que cuando está fosforilada actúa como un activador de los promotores regulados por NTR, el gen *ntrB* codifica una proteína que modula el grado de fosforilación y por lo tanto las propiedades de activación de NtrC.

De este modo NtrB fosforila a NtrC en condiciones de limitación de nitrógeno y la desfosforila bajo condiciones

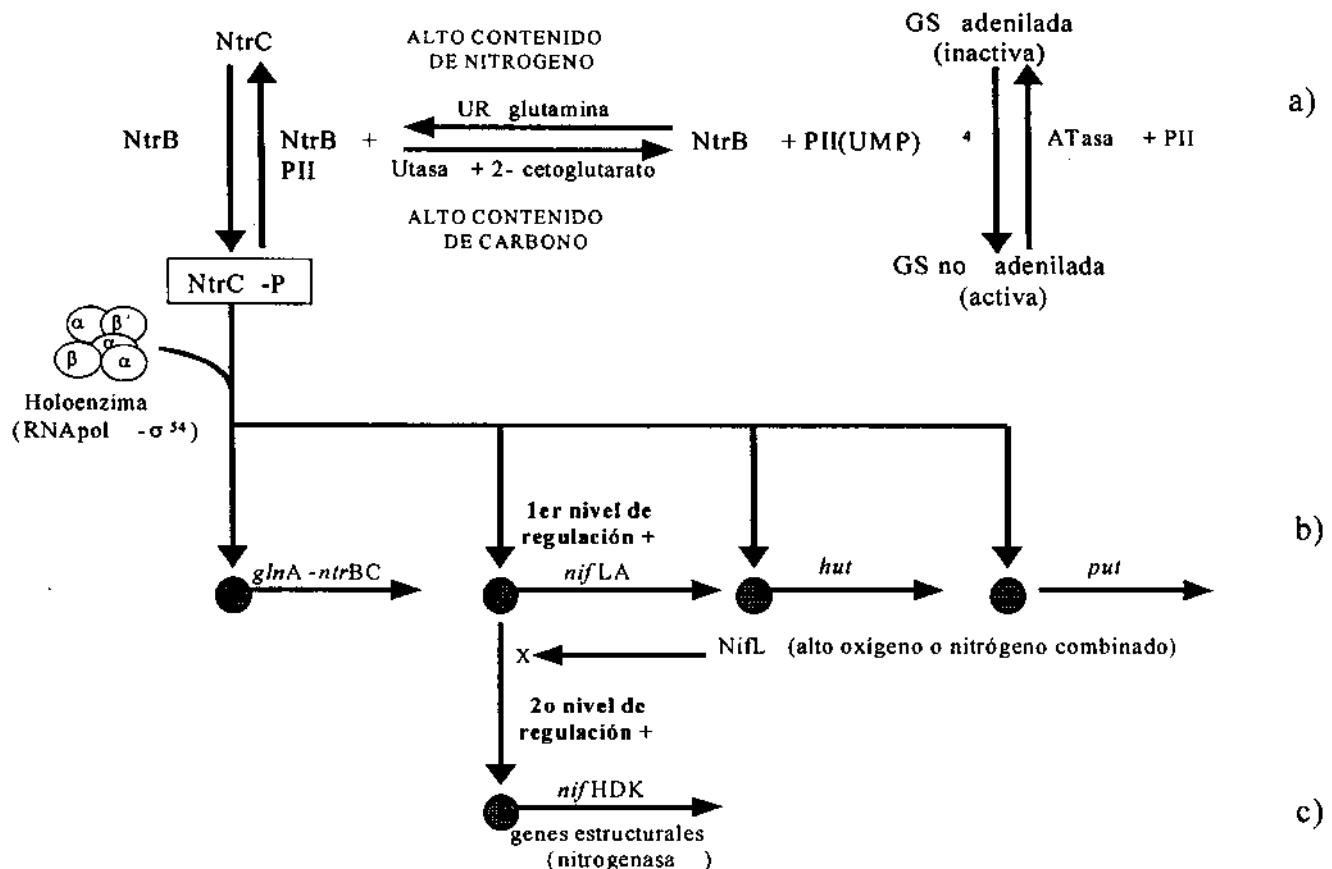


Figura 2. Modelo de la regulación de la fijación de nitrógeno. a) Regulación de la glutamato sintasa. b) Regulación transcripcional del operón *glnALG* y primer nivel de regulación positiva de los genes de fijación de nitrógeno (operón *nifLA*). c) Segundo nivel de regulación positiva de los genes de fijación de nitrógeno y de otros genes (*hut*, *put*) responsables del transporte y degradación de otras fuentes alternativas de nitrógeno<sup>17</sup>.



de suficiencia de este elemento. La actividad de NtrB es a la vez modulada por la proteína P II, la cual es producto del gen *glnB*. La actividad de esta proteína es controlada por la unión covalente o la remoción de uridina monofosfato (UMP) en respuesta al balance del nitrógeno en la célula.

La expresión de los genes *nif* de *K. pneumoniae* está bajo el control de NTR. Los promotores de estos genes *nif* tienen una secuencia consenso distintiva (5' TGGACN<sub>5</sub> TTGC 3') localizada en la región de -12 a -24 bases del sitio de inicio de la transcripción. Esta secuencia es típica de los promotores que utilizan una RNA polimerasa modificada por  $\sigma^{54}$ .

Los genes regulatorios específicos de los operones *nif* son *nifL* y *nifA* y la expresión de estos genes requiere de la forma fosforilada de NtrC y de un complejo de RNA polimerasa con el factor  $\sigma^{54}$  (Fig.2). La comparación de secuencias, ha demostrado que NifA es homóloga a NtrC y en algunos experimentos se ha probado que la función activadora de NifA sobre otros promotores *nif* es controlada negativamente por NifL en respuesta a elevados niveles de amonio y de oxígeno.<sup>6</sup>

## GENÉTICA DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN *Azospirillum*.

En *A. brasilense* se han reportado los siguientes genes *nifA* y *nifB*<sup>14</sup> y una región de DNA de 30 kb que contiene los genes *nifHDKY*, *nifENX*, *nifUSV*, *nifW* y *fixABCX*.<sup>10,19</sup> Los genes *nif* de este género están organizados de manera similar a los de *K. pneumoniae* y *Azotobacter*.<sup>8</sup>

Se ha demostrado que los genes *nifHDK* están organizados como una sola unidad transcripcional y bajo condiciones de fijación de nitrógeno la transcripción procede a partir del promotor *nifH* quien se controla positivamente por la proteína NifA unida a secuencias activadoras de la transcripción (UAS).<sup>22</sup>

La proteína NifA se sintetiza en forma inactiva bajo condiciones incompatibles con la fijación de nitrógeno (alto oxígeno y/o amonio).<sup>14</sup> A diferencia de lo que ocurre en *Klebsiella* la proteína NifA de *Azospirillum* no se activa con NtrC.<sup>14</sup> El mecanismo de activación de NifA de *Azospirillum*, no está establecido. Se ha sugerido como una propiedad intrínseca de esta proteína regulatoria su sensibilidad al oxígeno.<sup>25</sup>

## REGULACIÓN DE LOS GENES *nif* EN *Azospirillum*

Los mecanismos regulatorios de la fijación de nitrógeno en *Azospirillum* no están del todo elucidados. La cepa *A. brasilense* Sp<sub>6</sub> fue sometida a un proceso de mutagénesis<sup>1</sup> con nitrosoguanidina mediante el cual se lograron aislar 6 mutantes no fijadoras de nitrógeno, sin actividad de glutamato sintasa (GOGAT) y también incapaces de utili-

zar varias fuentes de nitrógeno combinado tales como: nitratos, nitritos, alanina, histidina, adenina y xantina. Las propiedades<sup>27</sup> de las 6 mutantes fueron semejantes a las de mutantes de *K. pneumoniae* descritas como  $asm^-$ .

Por otra parte al tratar<sup>23</sup> con nitrosoguanidina a *A. brasilense* Sp<sub>7</sub> fue posible obtener 8 mutantes que también presentaban un fenotipo Nif<sup>-</sup> regulatorio muy parecidas a las mutantes de *K. pneumoniae* afectadas en NifA. La fijación de nitrógeno de estas mutantes fue restaurada con el plásmido pCK3 que presenta una expresión constitutiva de NifA.<sup>12</sup>

También han sido aisladas varias mutantes resistentes a etilendiamina con un fenotipo Nif constitutivo o sea, que pueden seguir fijando nitrógeno aún en presencia de amonio (20 mM).<sup>4</sup> Estas mutantes presentan una actividad fijadora de nitrógeno hasta tres veces superior a la cepa silvestre, llegando incluso a excretar amonio. Cuando se inoculan a plantas de trigo, pueden generar incrementos significativos en el contenido de nitrógeno y materia seca con respecto a plantas inoculadas con la cepa silvestre.<sup>4</sup> Estas mutantes pueden habitar y fijar nitrógeno en estructuras semejantes a nódulos en raíces de arroz.<sup>3</sup>

Mediante hibridaciones con sondas de *Bradyrhizobium japonicum* se han logrado identificar<sup>14</sup> los genes *nifA* y *nifB* de *A. brasilense* Sp<sub>7</sub>. Al determinarse la secuencia nucleotídica, se confirmó una homología elevada entre los genes *nif* de ambos géneros bacterianos. Cuando se inactivó *nifA* y *nifB* de la cepa Sp<sub>7</sub> por mutagénesis sitio dirigida con el transposón Tn5, se obtuvieron mutantes con fenotipo Nif<sup>-</sup>. El mapa físico de la clona NifAB<sup>-</sup> de la cepa Sp<sub>7</sub> fue diferente al de la clona NifA<sup>-</sup> de la cepa Cd. Esto sugiere que además del gen *nifA*, *Azospirillum* contiene otro gen regulatorio que puede generar un fenotipo semejante a NifA<sup>-</sup>.

Por otro lado, la inactivación de los genes *ntrBC* por mutagénesis sitio dirigida generó mutantes de *A. brasilense* incapaces de utilizar nitratos como fuente de nitrógeno pero que mantuvieron su capacidad de fijación de nitrógeno<sup>15</sup> lo cual sugiere que NtrB y NtrC no son esenciales para la síntesis de la nitrogenasa en *Azospirillum* como se ha comprobado en *Azotobacter vinelandii* y en *Rhizobium meliloti*.<sup>30,28</sup> Recientemente se ha demostrado que la proteína NtrC es requerida para la expresión del transportador de amonio AmtB en *A. brasilense*.<sup>31</sup>

Se ha propuesto un modelo de regulación<sup>7</sup> de la fijación de nitrógeno para *Azospirillum* (Fig. 3), en el cual los genes *rpoN* y *glnB* son fundamentales puesto que *rpoN* controla la expresión de los genes *nif* mediante promotores dependientes del factor  $\sigma^{54}$ . Este factor también está involucrado en la actividad de NifA mediante el control de la transcripción de *glnB*. La proteína PII (producto de *glnB*) mantiene a NifA en forma activa bajo condiciones de fijación de nitrógeno. Todavía no se conoce el mecanismo de acción de PII excepto que el sitio blanco podría ser el dominio amino terminal de NifA. El factor  $\sigma^{54}$  participa también indirectamente en el control de la actividad nitrogena-

sa regulando la transcripción de *ntrC*, puesto que la nitrogenasa de mutantes NtrC escapan al sistema apagado-encendido con amonio.

Actualmente, se siguen realizando esfuerzos para estudiar y entender mejor la regulación de éste y otros fenómenos en *Azospirillum* con más y mejores herramientas entre las que destaca una muy poderosa como es el Mini Tn5 fusionado con *gusA*.<sup>32</sup>

La genética y regulación del metabolismo nitrogenado en *Azospirillum* tiene grandes similitudes con respecto a otros fijadores, especialmente con *K. pneumoniae*, aunque también tiene algunas características específicas sobretodo al nivel de la regulación global del metabolismo nitrogenado.

El conocimiento actual podría ser utilizado empleando técnicas de ingeniería genética. Tiene gran potencial la construcción de cepas excretoras de amonio que expresen constitutivamente los genes *nif* independientemente de la concentración de nitrógeno combinado y tensión de oxígeno lo cual puede realizarse combinando varias mutaciones. Por ejemplo construyendo mutantes cuya actividad de NifA sea independiente del producto de *glnB* (PII) y en las cuales la nitrogenasa escape al sistema de apagado-encendido con amonio. No debemos restar importancia a las mutantes que al azar se han obtenido con compuestos químicos y que presentan un gran potencial agrícola.

## REFERENCIAS

1. Bani, D., D. Barberio, M. Bazzicalupo, E. Gallori y M. Polsenelli. 1980. Isolation and characterization of glutamate synthase mutants of *Azospirillum brasilense*. J. Gen. Microbiol. 119:239-244.
2. Bashan, Y. y G. Holguin. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-pgpb (plant growth-promoting bacteria) and pgpb. Soil Biol. Biochem. 30:1225-1228.
3. Christiansen-Weniger, C. 1997. Ammonium-excreting *Azospirillum brasilense* C3-Gus-A inhabiting induced tumors along stem and roots of rice. Soil Biol. Biochem. 29:943-950.
4. Christiansen-Weniger, C. Y J. Van Veen. 1991. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. Appl. Environ. Microbiol. 57:3006-3012.
5. Dobereiner, J. y F. O. Pedrosa. 1987. The genus *Azospirillum*. En: Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Ed. Brock, T. D. Science Tech Publishers. Springer - Verlag. New York. p. 4 - 62.
6. Eady, R. 1992. The dinitrogen-fixing bacteria. En: The prokaryotes I. A. Balows, H. Truper, M. Dwrokin, W.

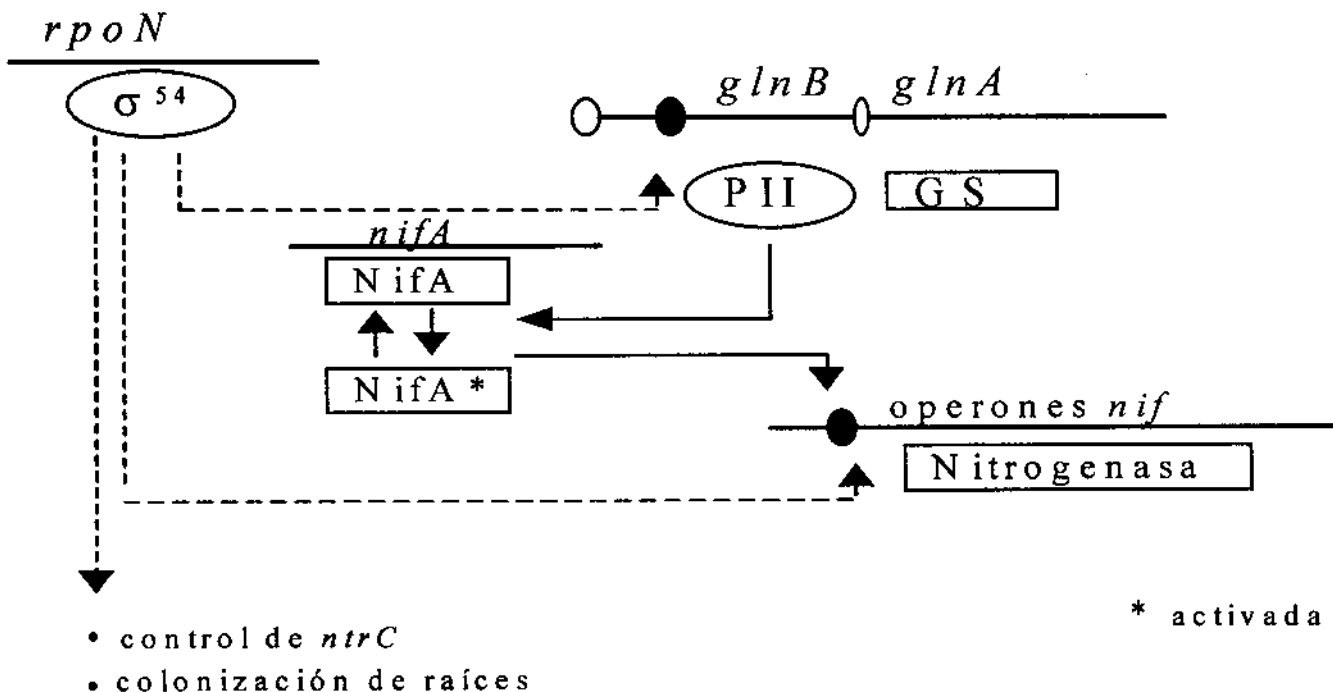


Figura 3. Modelo de la expresión de los genes *nif* en *Azospirillum*<sup>7</sup>



- Harder y K. Schleifer (Ed). Springer-Verlag. New York.
7. Elmerich, C., M. De Zamaroczy, F. Arsene, L. Pereg, A. Paquelin y A. Kaminski. 1997. Regulation of *nif* gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*. *Soil. Biol. Biochem.* 29:847-852.
  8. Elmerich, C., W. Zimmer y C. Vieille. 1992. Associative nitrogen-fixing bacteria. En: Biological nitrogen fixation. Eds. G. Stacey, R. Burris y H. Evans. Chapman and Hall, New York.
  9. Fu, H. A., W. P. Fitzmaurice, G. P. Roberts y R. Burris. 1990. Cloning and expression of *dra* TG genes from *Azospirillum lipoferum*. *Gene.* 86:95-98.
  10. Galimand, M., B. Perroud, F. Delorme, A. Paquelin, C. Veille, H. Bozoukilian y C. Elmerich. 1989. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes *nif* E, *nif* US and *fix* ABC in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Gen. Microbiol.* 135:1047-1059.
  11. Hartmann, A., H. Fu y R.H. Burris. 1986. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* sp. J. *Bacteriol.* 165:864-879.
  12. Kennedy, C. y M. Drummond. 1985. Use of cloned *nif* regulatory elements from *Klebsiella pneumoniae* to examine *nif* regulation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* 131:1787-1795.
  13. Khammas, K. M., E. Ageron, P. Grimont y P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140:679-693.
  14. Liang, Y., P. Kaminski y C. Elmerich. 1991. Identification of a *nif* A- like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. *Mol. Microbiol.* 5:2735-2744.
  15. Machado, H., M. Yates, S. Funayama, L. Rigo, M. Steffens, E. Souza y F. Pedrosa. 1995. The *ntr* BC genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nif* R3-like-*ntr* B-*ntr* C operon and are negatively regulated. *Can. J. Microbiol.* 41:674-684.
  16. Magalhaes, F. M., J. I. Baldani, S. M. Souto, Kuykendall y J. Dobereiner. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Cienc.* 55:417-430.
  17. Magasanik, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* 16: 135-168.
  18. Merrick, M. J. 1988. Nitrogen regulation of nitrogen fixation. En: Nitrogen source control of microbial processes. S. Sánchez-Esquivel (Ed). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
  19. Milcamps, A., V. Keyers y J. Vanderleyden. 1993. Identification of a *nif*W-like gene in *Azospirillum brasilense*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1173:237-238.
  20. Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Tibtech.* 3:223-226.
  21. Okon, Y., E. Fallik, S. Sarik, E. Yahalom y S. Tal. 1988. Plant growth promoting effects of *Azospirillum*. En: Nitrogen fixation. Hundred year after. Eds. Bothe/De Brujin. Gustav Fischer. Stuttgart. New York.
  22. Passaglia, L., A. Schrank y I. Schrank. 1995. The two overlapping *Azospirillum brasilense* upstream activator sequences have differential effects on *nifH* promoter activity. *Can. J. Microbiol.* 41:849-854.
  23. Pedrosa, F. y M. Yates. 1984. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nif* A and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* 23:95-101.
  24. Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kertzers, D., Thielemans y J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:47-51.
  25. Shigema0tsu, T., A. Inove, M. Hidaka, H. Masaki y T. Vozumi. 1997. Oxygen sensitivity of *NifA* protein of *Azospirillum lipoferum* FS as suggested by gene cloning and expression in *E. coli*. *Biosc. Biotechn. Biochem.* 61:768-771.
  26. Song, S., A. Hartmann y R. Burris. 1985. Purification and properties of the nitrogenase of *Azospirillum amazonense*. *J. Bacteriol.* 164:1271-1277.
  27. Streicher, S., E. Gurney y R. Valantine. 1972. The nitrogen fixation genes. *Nature.* 239:495-499.
  28. Szeto, W, T. Nixon, C. Ronson y F. Ausubel. 1987. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntr* C gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activating nitrogen fixation genes in free-living and in symbiotic cells. *J. Bacteriol.* 169:1423-1432.
  29. Tarrand, J. J., N. R. Krieg y J. Dobereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. *Can. J. Microbiol.* 24:967-980.
  30. Toukdarian, A. y C. Kennedy. 1986. Regulation of nitrogen metabolism in *Azobacter vinelandii*: Isolation of *ntr* and *gln* A genes and construction of *ntr* mutants. *EMBO J.* 5:399-407.
  31. Van Dommelen, A., V. Keijers, J. Vanderleyden y M. de Zamaroczy. 1998. (Methyl) ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 180:2652-2659.
  32. Xi, C. M., M. Lambrecht, J. Vanderleyden y J. Michiels. 1999. Bi-functional *gfp*-and *gusA*-containing mini-Tn 5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. *J. Microbiol. Methods.* 35:85-92.
  33. Zhang, Y., R. Burris y G. Roberts. 1992. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *dra T* and *dra G* genes from *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 174:3364-3369.