

03062
10
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL CCH.

"AISLAMIENTO DE NODULINAS TEMPRANAS DE FRIJOL
(Phaseolus vulgaris)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

LIC. EN IBB. JUAN MIRANDA RIOS

FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR., FEBRERO DE 1991.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco al Dr. Federico Sánchez por haberme permitido participar en su grupo de investigación. A los Dres. Alejandra Covarrubias, Patricia Joseph, Mario Rocha y Miguel Lara por su ayuda en la revisión de este trabajo.

Agradezco de manera especial a los Dres. Alejandra Covarrubias, Mario Rocha y Jaime Padilla por sus consejos prácticos y sus estimulantes discusiones a todo lo largo del proyecto; al Dr. David Romero por su ayuda durante mi cambio de tutor y de proyecto y a la Dra. Esperanza Martínez por su apoyo y comprensión durante la escritura de esta tesis.

Asimismo agradezco las becas que me otorgó el CONACyT y la DGAPA de la UNAM que me permitieron continuar mis estudios.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
A) GENES DE LA BACTERIA.....	3
B) GENES DE LA PLANTA.....	4
C) ONTOGENIA DEL NODULO.....	5
1) PRE-INFECCION.....	5
2) INFECCION.....	6
3) FORMACION DEL PRIMORDIO.....	7
4) DIFERENCIACION A NODULO.....	8
5) FUNCIONAMIENTO DEL NODULO.....	9
ANTECEDENTES.....	12
OBJETIVO.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	22
FIGURAS.....	26
TABLAS.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	41

RESUMEN

Las asociación simbiótica entre las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* dá por resultado el desarrollo de nódulos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. Varios genes de la planta y de la bacteria están involucrados específicamente en la formación de los nódulos.

Los experimentos reportados en esta tesis tuvieron como objetivo la caracterización de algunos genes de la planta que se expresan durante las primeras fases del desarrollo del nódulo; a los productos de estos genes se les llama nodulinas tempranas. Las nodulinas tempranas participan en el proceso de infección por *Rhizobium*, la transducción de señales provenientes de la bacteria y en aspectos estructurales de la morfogénesis del nódulo.

Por medio de hibridación diferencial se aislaron 12 clonas de ADNC a partir de una genoteca de raíces infectadas por *Rhizobium* al 8½ día de la inoculación. Los tamaños de los insertos de estas clonas varían entre 300 y 1,200 pares de bases.

Se escogió una de las clonas al azar (la pJMR-17) y se estudió su expresión mediante experimentos tipo northern. Se observó que no se expresa en ARN proveniente de raíces sin infectar, se expresa en niveles reducidos en raíces infectadas de 7 días, aumentando su expresión en raíces infectadas de 11 días y se mantiene constante en nódulos de 17 y 21 días. Este patrón de expresión es similar al de otras nodulinas tempranas reportadas con anterioridad.

Se obtuvo la secuencia nucleotídica de esta clona para tener mayor información sobre el producto que codifica. El análisis de la secuencia predice un marco abierto de lectura de 573 bases que codifica para una proteína de 191 aminoácidos, con un PM. de

20,856 Dal. Presenta un péptido señal potencial en el extremo amino-terminal y sitios posibles de modificación post-traduccionaI como la N-glicosilación y la fosforilación por proteina cinasa I y caseína cinasa II. También presenta una región PEST similar a la que se encuentra en proteínas con una vida media corta.

No se encontró ninguna secuencia homóloga al comparar la secuencia nucleotídica y de aminoácidos predicha de esta clona con las secuencias almacenadas en GenBank y EMBL, ni con las secuencias de las nodulinas tempranas Enod-2, Enod-3, Enod-5, Enod-12, Enod-13, Enod-14 y Enod-55.

Se discuten algunas posibles funciones de la nodulina temprana codificada en la clona pJMR-17.

INTRODUCCION

Las interacciones entre plantas y bacterias se presentan con frecuencia en la naturaleza; algunas se dan entre las bacterias patogénicas y sus plantas hospederas mientras que otras asociaciones son benéficas. Estas últimas revisten gran importancia para las plantas pues se estima que cerca del 90% de las plantas terrestres no sobrevivirían sin la presencia de sus compañeros simbióticos (los hongos y las bacterias).

La fijación del nitrógeno a través de bacterias que establecen una simbiosis con plantas es el mayor contribuyente al ciclo del nitrógeno (Verma y Delauney, 1988), y tiene una gran importancia agrícola al permitir el crecimiento vegetal en suelos deficientes de nitrógeno. Además, al no requerirse la adición de fertilizantes los costos de producción son menores y se cuida el equilibrio ecológico del suelo.

Actualmente contamos con una visión general del proceso de la formación y la función del nódulo que es un órgano que se produce en las raíces de algunas especies de plantas de la familia *Leguminosae* debido a la interacción entre éstas y las bacterias del género (*Bradi*)*Rhizobium*. Es en este singular órgano donde se lleva a cabo la fijación del nitrógeno (Rolfe y Gresshoff, 1988).

La compleja serie de eventos que dan por resultado la formación y el funcionamiento del nódulo requieren de la expresión controlada y coordinada de los genes de la planta y de la bacteria que intervienen en este proceso.

A) GENES DE LA BACTERIA

En varias especies de *Rhizobium* se han estudiado los genes que participan en el establecimiento de la simbiosis (Long, 1989). Estos genes se encuentran presentes en plásmidos de alto peso molecular llamados plásmidos simbióticos (abreviados como pSym) en los *Rhizobium*, mientras que en los *Bradirhizobium* están contenidos en el cromosoma bacteriano (Hooykaas y cols., 1978).

Podemos clasificar a los diferentes genes bacterianos que participan en la simbiosis en 5 grupos: los genes de nodulación comunes (*nodABC*), los genes de especificidad de hospedero (*hcn*), el gene *nodD* que participa en la regulación de los genes *nod* comunes y *hcn*, los genes *nif* y *fix* responsables de la fijación del nitrógeno y los genes involucrados en la síntesis de polisacáridos (Martínez y cols., 1990).

Los *Rhizobium* producen y excretan compuestos de bajo peso molecular, estables al calor que producen tres efectos en la planta: a) la deformación de los pelos radiculares (fenotipo Had), b) el engrosamiento y acortamiento de las raíces (fenotipo Tsr) y c) la

inducción de pelos radiculares (fenotipo Hai). Se requiere la presencia de los genes *nodABC* para la síntesis de estos compuestos. Además, las proteínas NodA y NodB (codificadas por los genes *nodA* y *nodB*) intervienen en la síntesis de un compuesto que estimula la mitosis en protoplastos vegetales (Schmidt y cols., 1988).

Se han identificado algunos de los factores que provocan cambios morfogénéticos en la planta (Lerouge y cols., 1990). Uno de ellos, denominado NodRm-1 (factor de nodulación 1 de *Rhizobium meliloti*) se purificó siguiendo un bioensayo del fenotipo Had que es positivo en alfalfa (la planta hospedera de *R. meliloti*) y negativo en el algarrobo. El análisis de la estructura química del factor de nodulación indica que se trata de un tetrasacárido de D-glucosamina, sulfatado, con tres de sus grupos amino acetilados y el otro está acilado con una cadena de ácido graso insaturado de 16 carbonos de longitud (Lerouge y cols., 1990). No se conoce la vía de síntesis de esta molécula ni el papel que juegan cada uno de los productos de los genes *nodABC* en ella. Es importante señalar que existen antecedentes de que algunos oligosacáridos se han propuesto como moléculas reguladoras de diversos procesos morfogénéticos en vegetales (Tran Thanh Van y cols., 1985).

Tampoco se conoce el mecanismo por el cual el factor de nodulación desencadena el desarrollo del nódulo, pero se cree que provoca cambios en las concentraciones relativas de fitohormonas. Se ha visto que la adición de los ácidos 2,3,5-triyodobenzoico (TIBA) y N-(1-naftil)ftalámico (NAP), que son inhibidores del transporte de auxinas, pueden provocar el desarrollo de estructuras semejantes a nódulos. Además, este efecto es observado al añadir estos compuestos en concentraciones fisiológicas (10^{-5} M) (Hirsch y cols., 1989). Por otro lado, es posible complementar parcialmente una mutante Nod⁻ de *R. meliloti* con la introducción y la expresión de un gene de zeatina, involucrado en la síntesis de las fitohormonas citoquininas (Long y Cooper, 1988). Así, el desarrollo del nódulo puede verse como la resultante de un cambio en el balance de fitohormonas provocado directa o indirectamente por el factor de nodulación.

B) GENES DE LA PLANTA

Por experimentos de genética clásica se encontró que algunos genes de la planta participan de una manera muy importante a lo largo de todo el proceso simbiótico (Vincent, 1980; Gresshoff y cols., 1985; Gresshoff y Delves, 1986). Muchas funciones de la planta están involucradas en la iniciación y la función del nódulo. Algunas de ellas están bajo el control de la bacteria y otras son reguladas durante el desarrollo por factores endógenos.

Las proteínas de la planta que se expresan específicamente durante la formación y función de los nódulos reciben el nombre de nodulinas (van Kammen, 1984) y tienen como función la de satisfacer los requerimientos estructurales, metabólicos y de transporte de la fijación del nitrógeno; se han identificado cerca de una veintena de nodulinas en las siguientes leguminosas: soya (Fuller

y cols., 1983; Gloude-mans y cols., 1987), chicharo (Govers y cols., 1985), alfalfa (Lullien y cols., 1987), frijol (Campos y cols., 1987) y cowpea (Trese y Pueppke, 1990). Además de los genes inducidos específicamente, existen otros que ven modificados sus niveles de expresión durante esta simbiosis, ya sea incrementándola (nst o estimulados en el nódulo) o disminuyéndola (Govers y cols., 1985; Gloude-mans y cols., 1987; Trese y Pueppke, 1990).

Las nodulinas se expresan de manera diferencial durante el desarrollo del nódulo y se han clasificado operacionalmente como tempranas y tardías de acuerdo al momento en que se expresan (Govers y cols., 1985).

Las tempranas intervienen directamente en la morfogénesis del nódulo y durante la infección de las células vegetales por el *Rhizobium*. Se han identificado algunas de ellas en chicharo (Govers y cols., 1985), soya (Gloude-mans y cols., 1987), algarrobo (Moerman y cols., 1987) y alfalfa (Norris y cols., 1988).

Las tardías comprenden un grupo grande de genes que son expresados un poco antes del inicio de la fijación del nitrógeno y han sido caracterizadas en una decena de leguminosas (Delauney y Verma, 1988). Ayudan al funcionamiento del nódulo creando y manteniendo las condiciones fisiológicas necesarias para que ocurra la fijación del nitrógeno, la asimilación y el transporte de los compuestos nitrogenados. Entre las nodulinas tardías encontramos a la leghemoglobina, la uricasa II, la sacarosa sintasa y a la glutamina sintetasa.

C) ONTOGENIA DEL NODULO

Vincent (1980) al describir la formación del nódulo distingue tres etapas: "pre-infección", "infección y formación del nódulo" y "función del nódulo" (ver figura 1).

1) PRE-INFECCION

En esta etapa se observa la colonización de la rizósfera por el *Rhizobium* (figura 1, panel A). Posteriormente por quimiotaxis el *Rhizobium* viaja hacia las raíces en una respuesta inducida por los compuestos flavonoides que éstas excretan (Caetano-Anolés y cols., 1988). Los rhizobia se adhieren a la superficie externa de los pelos radiculares que acaban de brotar y excretan el factor de nodulación que provocará la deformación y el enroscamiento de los mismos (figura 1, panel B). Este enroscamiento se cree que es causado por una estimulación local del crecimiento del extremo del pelo radicular. Aún en esta etapa tan temprana de la interacción se observa una alta especificidad pues sólo el *Rhizobium* homólogo puede responder a los flavonoides excretados por su hospedero y producir en él la deformación y el enroscamiento de los pelos radiculares (Rolfe y Gresshoff, 1988; Long, 1989).

Se han estudiado los cambios en la expresión genética de los pelos radiculares al ser inoculados con las bacterias porque en ellos principia la infección. En chícharo se han caracterizado dos proteínas y una nodulina temprana (GlouDEMANS y cols., 1989; Scheres y cols., 1990a). Las proteínas son la RH-42 y la RH-44. La proteína RH-42 es de naturaleza acidica y se le detecta 20 hrs. después de la inoculación con una cepa de *Rhizobium* que contenga al menos los genes *nodABC* funcionales. La proteína RH-44 se encuentra presente en los pelos radiculares antes de la infección y, al ocurrir ésta, se incrementa grandemente. El otro gene que se expresa en esta etapa en los pelos radiculares es el *PsEnod12* que codifica para una nodulina temprana y se expresa también en nódulos jóvenes; más adelante me referiré a las características de este gene.

2) INFECCION

Debido al enroscamiento de los pelos radiculares, las bacterias quedan atrapadas por lo que se piensa que la alta concentración local del factor de nodulación excretado por la bacteria es el paso decisivo para la inducción de la infección. Esta se origina con una hidrólisis muy limitada de la pared celular del pelo radicular, aunque no se conoce el mecanismo. En el sitio de la hidrólisis la bacteria penetra a la célula vegetal a través de una invaginación de la membrana plasmática. Alrededor de esta membrana la planta forma una estructura tubular por deposición de material de pared celular; a esta estructura se le llama hilo de infección (Verma y Long, 1983; Long, 1989) (figura 1, panel C). Conforme el hilo de infección penetra a la célula del pelo radicular, la bacteria prolifera dentro del hilo y se rodea de una matriz de polisacárido. Los hilos de infección llevan a la bacteria desde el pelo radicular hasta el primordio del nódulo que está en formación en la corteza de la raíz.

En las células de la corteza suceden una serie de cambios antes de que el hilo de infección los penetre: una reorganización de los microtúbulos, la migración del núcleo hacia el centro de la célula y la formación adicional de pared celular. Se piensa que estos cambios se producen en respuesta a una señal proveniente del hilo de infección. Todos estos cambios se asemejan a los que se observan durante la profase del ciclo celular (figura 1, panel C).

En chícharo se conocen dos nodulinas tempranas que se expresan durante la etapa de infección: la *PsEnod5* (Scheres y cols., 1990b) y la *PsEnod12* (Scheres y cols., 1990a) que fueron aisladas mediante un tamizaje diferencial a partir de una genoteca de ADNc de nódulos de chícharo. El análisis de la secuencia nucleotídica de ambas clonas nos indica que codifican para proteínas ricas en hidróxi-prolina, semejantes a algunas proteínas que se encuentran en la pared celular.

La proteína *Enod12* tiene un peso molecular de 12.5 KDaL. y presenta un posible péptido señal en el extremo amino-terminal. El resto de la proteína está compuesto por dos unidades de repetición de 5 aminoácidos: Pro-Pro-Gln-Lis-Glu y otra que es Pro-Pro-Val-Asn-Gli. La proteína *Enod5* tiene un peso

molecular de 14 KDal.; su secuencia presenta dominios hidrofóbicos tanto en el extremo amino terminal (que pudiera ser un péptido señal) como en el carboxilo. Entre los aminoácidos 88 y 108 posee un alto contenido de prolinas que están alternando con serinas y treoninas. Debido a que posee un alto contenido de Pro, Ser, Ala y Gli se asemeja a las proteínas arabinogalactanas (van Holst y cols., 1981).

El gene PsEnod5 se expresa sólo en células conteniendo hilos de infección en crecimiento (Scheres y cols., 1990b). Ya que las arabinogalactanas son proteínas de membrana plasmática, es probable que la proteína Enod5 forme parte de la membrana plasmática de los hilos de infección.

El gene PsEnod12 se expresa en los pelos radiculares y en las células corticales que contienen un hilo de infección en crecimiento. A diferencia de la PsEnod5, también se expresa en células que están varias capas por delante del hilo de infección.

En soya se han aislado otros dos genes de nodulinas tempranas: el GmEnod-13 y el GmEnod-55. Ambos codifican para proteínas ricas en Hidroxi-prolina aunque sólo el producto de GmEnod-13 presenta homología a la proteína Enod-2 (Franssen y cols., 1988).

Otras moléculas que se cree intervienen en este estadio son las lectinas. Un experimento que apoya esta creencia es el siguiente: *R. leguminosarum* bv. *viciae* puede infectar y nodular chícharo y algarrobo, pero no al trébol blanco. Si por medio de transformación de raíces se introduce un gene de lectina de chícharo al trébol blanco, ahora puede formar hasta hilos de infección en el trébol (Díaz y cols., 1989). Esto nos indica que la lectina de chícharo de alguna forma interviene en la especificidad de hospedero durante la formación del hilo de infección.

3) FORMACION DEL PRIMORDIO

Mientras el hilo de infección penetra a las células de la raíz y viaja hacia adentro, las células totalmente diferenciadas de la corteza radicular son reactivadas y de nuevo se empiezan a dividir, formando el primordio del nódulo (figura 1, panel D). Este es uno de los cambios en el destino de una célula más dramáticos observados en el desarrollo de un sistema eucariote.

Las leguminosas templadas como el chícharo, el algarrobo, el trébol y la alfalfa forman nódulos indeterminados, con forma de maza, que poseen un meristemo apical persistente. En estas plantas los nódulos se originan de células localizadas en la corteza interna de la raíz, en el lado opuesto al polo de xilema del sistema vascular.

En contraste, la mayoría de las leguminosas tropicales como la soya y el frijol forman nódulos determinados, de forma globular, en los que la actividad mitótica cesa durante el desarrollo y el incremento de tamaño se debe a expansión celular y

no a crecimiento. Los nódulos en este caso se originan de las divisiones inducidas en la corteza exterior de la raíz (Newcomb y cols., 1979).

Durante el desarrollo de ambos tipos de nódulos, los hilos de infección crecen hacia el primordio. Al hacer contacto con él, los hilos se ramifican y penetran a las células de la región central del primordio. En estas células, la bacteria es expulsada del hilo de infección e introducida en el citoplasma de la célula vegetal. Esta liberación se da por un proceso endocitótico en el que la bacteria es recubierta por un tipo especial de membrana, llamada membrana peribacteroidal (figura 1, panel E).

Concomitantemente con la liberación de las bacterias, algunas capas celulares en el extremo distal del primordio se diferencian para dar lugar a células pequeñas y ricas en citoplasma que formarán el meristemo del nódulo indeterminado. Sólo las células del primordio expresan el gene PsEnod12, mientras que las células del meristemo dejan de expresarlo.

4) DIFERENCIACION A NODULO

A partir del meristemo se producen los dos tipos de tejidos que se observan en un nódulo desarrollado: el central y el periférico. El tejido periférico consta de la corteza y la endodermis, además del parénquima que contiene a los haces vasculares que conectan al nódulo al tallo radicular. El tejido central es el más característico del nódulo. En los nódulos indeterminados se observan tres zonas de desarrollo:

En la zona de invasión, adyacente al meristemo, se da la liberación de bacterias para infectar nuevas células; aproximadamente la mitad de ellas no son infectadas. Le sigue la zona simbiótica temprana, en la que las células vegetales se elongan y las bacterias proliferan. En la zona simbiótica tardía, las células infectadas son llenadas por bacterias que se han diferenciado a bacteroides. Es en esta zona donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. En nódulos más viejos aparece una cuarta zona de senescencia, en donde ambos simbioses degeneran. Debido a la persistencia del meristemo apical, todas las fases del desarrollo se observan en un sólo nódulo.

Todas las células del tejido central de los nódulos determinados progresan a través del mismo estadio de desarrollo. Las pequeñas células no-infectadas se encuentran interdispersas entre las infectadas y asimilan el nitrógeno fijado en ureidos (Schubert, y cols., 1986). En contraste, no se ha observado alguna especialización de las células no-infectadas del nódulo indeterminado.

En el nódulo indeterminado se han ampliado estos estudios por medio de hibridación *in situ*, confirmando la existencia de varias zonas distintas de desarrollo (Scheres y cols., 1990b). El gene PsEnod12 se expresa en todas las células de la zona de invasión, lo cual es consistente con su posible papel en el proceso de infección (Scheres y cols., 1990a). No se le detecta en zonas más

viejas.

El gene PsEnod5 se expresa también en la zona de invasión, pero aumenta su expresión en las células infectadas de la zona simbiótica temprana (Scheres y cols., 1990b). En estas células los hilos de infección han dejado de crecer y las bacterias proliferan, al tiempo que un aparato de síntesis de membranas muy activo las rodea para formar la membrana peribacteroidal. Pudiera ser que debido a su alta expresión y su similitud a las proteínas arabinogalactanas, la proteína Enod5 forme parte de la membrana peribacteroidal o de la membrana que rodea la extremidad del hilo de infección.

En las células infectadas de la zona simbiótica temprana se expresan otros dos genes de nodulinas tempranas (Scheres y cols., 1990b). Estos son el PsEnod3 y PsEnod14. El análisis de sus secuencias nucleotídicas nos muestra que codifican para polipéptidos de 6 KDal. de peso molecular y que son 55% homólogos entre sí. Ambos poseen un posible péptido señal en el amino terminal y contienen cuatro cisteínas en posición tal que podrían unir algún metal y transportarlo a los bacteroides (por ejemplo, Fe o Mo necesarios para la hidrogenasa y la nitrogenasa, respectivamente). Estos genes se expresan transitoriamente: sus niveles descienden en la zona simbiótica tardía, en donde empiezan a acumularse las nodulinas tardías.

Al tejido periférico se le ha atribuido un papel en la morfología del nódulo. El parénquima presenta una estructura compacta con espacios intercelulares pequeños y escasos que se piensa forman una barrera a la difusión del oxígeno. Aunado al alto consumo de O₂ por los bacteroides y a la presencia de leghemoglobina, se propicia el ambiente adecuado para el funcionamiento de la nitrogenasa.

En el parénquima de los nódulos de chicharo y de alfalfa se expresa el gene de la nodulina temprana PsEnod2 (van de Wiel y cols., 1990a y b). De manera semejante, se observa que la expresión del gene GmEnod2 ocurre en el parénquima de los nódulos de soya. Los genes PsEnod2 y GmEnod2 (Franssen y cols., 1987) son estructuralmente parecidos al de PsEnod12. Están compuestos por 2 pentapéptidos alternados, cada uno conteniendo dos prolinas. Esta estructura sugiere que son componentes de la pared celular. Debido a que esta estructura es el mayor determinante de la morfología celular, es probable que la proteína Enod2 contribuya a la morfología especial de las células del parénquima.

5) FUNCIONAMIENTO DEL NODULO

El establecimiento de la zona simbiótica temprana marca el fin de la morfogénesis del nódulo. Posteriormente se da una diferenciación bioquímica producida en gran medida por la expresión de las nodulinas tardías, que crean y sustentan el ambiente apropiado para la fijación del nitrógeno y la asimilación de los compuestos nitrogenados por parte de la planta (figura 1, panel F).

Muchas de ellas se han clonado y secuenciado. Delauney y Verma (1988) presentan una lista de ellas.

La mejor estudiada es la leghemoglobina (Lb). En soya se han clonado todos los genes que la codifican. Se sabe que es la más abundante: constituye hasta el 25% de la proteína soluble total del nódulo maduro, dándole su característico color rosado.

La Lb es una oxihemoproteína con una alta afinidad por el O₂ (Appleby, 1984), semejante a las globinas de los vertebrados. En combinación con la morfología especial del nódulo, la Lb controla la concentración de O₂ en el nódulo. La Lb es una verdadera proteína simbiótica pues se cree que el grupo hemo es de origen bacteriano y la parte de la globina está codificada en el genoma vegetal.

Se han identificado otras nodulinas tardías que funcionan en el metabolismo de nitrógeno como la GS (Miflin y Lea, 1980; Lara y cols., 1983; Bennet y cols., 1989) y la uricase II (Bergman y cols., 1983; Nguyen y cols., 1985; Sánchez y cols., 1987) o de carbono como la sacarosa sintasa (Thummler y Verma, 1987). Todas ellas realizan funciones que no son únicas al funcionamiento del nódulo, ya que se expresan en otras partes de la planta. Debido a esto, Nap y Bisseling (1990) han desarrollado la hipótesis de que la formación del nódulo evolucionó de alteraciones menores en la vía de la diferenciación de la raíz. Los genes comunes se adaptaron para cumplir con las nuevas necesidades fisiológicas y regulatorias que impone la simbiosis.

Varias de las nodulinas tardías se encuentran asociadas a la membrana peribacteroidal que forma una barrera física y metabólica entre el citoplasma de la célula vegetal y el bacterioide, aunque se desconoce la función bioquímica de la mayoría de estas nodulinas (Fortin y cols., 1985).

Entre las más estudiadas se encuentra la nodulina Ngm-26 de soya (Fortin y cols., 1987) cuya estructura hace suponer que es una proteína transmembranal y que tiene homología a la proteína facilitadora del transporte de glicerol de *E. coli* (Baker y Saier., 1990) y a la proteína intrínseca del cristalino de bovino (que es el componente principal de las uniones ocluseras o "gap junctions" de la membrana de este tejido) (Sandal y Marcker, 1988). La función de esta nodulina podría ser la de transportar algún metabolito a través de la membrana peribacteroidal.

Otra nodulina asociada a esta membrana es la Ngm-24 de soya que contiene 3 dominios hidrofóbicos en su secuencia de aminoácidos que le permiten atravesar la membrana peribacteroidal (Katinakis y Verma, 1985).

También se ha visto que algunos de los miembros de una familia génica de nodulinas de soya están asociados a esta estructura; encontramos entre sus miembros a las nodulinas Ngm-20, -22, -23, -26b, -27 y -44. Sus genes se transcriben de manera considerable; sus productos presentan dos dominios con cisteínas apareadas de forma que pueden unir algún tipo de metal y un

posible péptido señal en el extremo amino-terminal (Jacobs y cols., 1987; Sandal y cols., 1987). En frijol se han estudiado una serie de productos generados por traducción *in vitro* muy abundantes cuyo peso molecular es de 30 KDal., los que reciben el nombre de Npv-30 (Campos y cols., 1987). El análisis de la secuencia de dos clonas de ADNc que codifican para estos productos muestra que contienen dos dominios con cisteínas capaces de unir algún metal y un posible péptido señal en el amino-terminal por lo que poseen una homología alta con la familia de soya anteriormente descrita (Campos, F., datos no publicados).

Las nodulinas tardías se expresan de manera coordinada durante el desarrollo del nódulo por lo que se puede suponer que poseen elementos comunes en las regiones regulatorias de sus genes. Se ha demostrado la importancia de la región promotora de estos genes en la expresión genética específica de nódulo mediante el empleo de plantas transgénicas. Se han estudiado las regiones promotoras del gene *lbc3* de soya (Stougaard y cols., 1986 y 1987) y de *Sesbania rostrata* (Metz y cols., 1988), de la *Ngm-23* de soya (Jrgensen y cols., 1988) y del gene *gln-7* que codifica para la isoforma de GS que se encuentra aumentada en los nódulos de frijol (Forde y cols., 1989). Por medio de estos estudios se definió a las secuencias AAAGAT y CTCTT como las secuencias consenso involucradas en la expresión específica de nódulo de las nodulinas tardías (Sandal y cols., 1987).

Además se han estudiado algunos de los factores que actúan en *trans* que se unen a regiones ricas en A/T en la región 5' de los genes antes mencionados (Jensen y cols., 1988; Stougaard y cols., 1990; Forde y cols., 1990; Jacobsen y cols., 1990). Estos factores se encuentran en extractos de nódulos (como el NAT-2), en extractos de raíz y de nódulo (como el NAT-1) y en extractos de hojas jóvenes (como el LAT-1). Los factores LAT-1 y el NAT-1 poseen características que los asemejan a las proteínas HMG-1 de humano, las cuales se piensa que provocan cambios en la estructura de la cromatina que facilitan la interacción entre los factores de la transcripción y sus respectivos promotores. El factor NAT-2 reconoce secuencias similares a las reconocidas por el factor SAR de *Drosophila* que está involucrado en la unión del ADN a la estructura de sostén nuclear ("nuclear scaffold structure") por lo que también podría modificar la conformación de la cromatina facilitando la transcripción (Jacobsen y cols., 1990).

En cuanto a las nodulinas tempranas sólo se cuenta con la secuencia de la región 5' de la *Enod-2* de soya y no presenta las secuencias consenso de las nodulinas tardías, ni regiones ricas en A/T, por lo que se piensa que los factores que inducen la expresión de las nodulinas tempranas deben ser diferentes del de las tardías (Franssen y cols., 1989).

El análisis molecular de las regiones promotoras y de los factores que actúan en *trans* nos permitirá descubrir los mecanismos implicados en la regulación genética de las nodulinas (tanto tempranas como tardías) y nos ayudará a entender como es que el *Rhizobium* a través de unas pocas señales es capaz de inducir cambios morfogenéticos y metabólicos en las plantas leguminosas.

ANTECEDENTES

En el grupo del Dr. Federico Sánchez se han venido aislando y estudiando algunas nodulinas tardías de frijol con el propósito de conocer su participación en el funcionamiento del nódulo. Hasta la fecha se han aislado clonas de una genoteca de ADNc que codifican para la uricasa II (Sánchez y cols., 1987) y la Npv-30 (Campos y cols., 1987). También se han hecho estudios sobre la expresión de las isoformas de la glutamino sintetasa (Padilla y cols., 1987) y de otras nodulinas en nódulos producidos por cepas de *Rhizobium* que alteran alguno de los pasos del desarrollo del nódulo (Padilla y cols., sometido a revisión).

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de los nódulos fijadores de nitrógeno es necesario estudiar los genes de la planta que participan en este proceso, en particular los genes que se expresan al principio del desarrollo del mismo (las nodulinas tempranas) por lo que nos planteamos el siguiente

OBJETIVO

EL OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO CONSISTIO EN EL AISLAMIENTO DE CLONAS QUE CONTUVIERAN SECUENCIAS DE NODULINAS TEMPRANAS DE FRIJOL, A PARTIR DE UNA GENOTECA DE ADNc DE RAICES INFECTADAS CON RHIZOBIUM PHASEOLI CE-3. ADEMÁS, SE ESTUDIO LA EXPRESION Y SE OBTUVO LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE UNA DE LAS CLONAS AISLADAS.

MATERIALES Y METODOS

a) CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa; PRONASE, México) fueron esterilizadas en la superficie y germinadas por 48 horas sobre toallas húmedas y estériles. Las plántulas se transfirieron a macetas de 30 cm. conteniendo vermiculita estéril y fueron inoculadas con 1 ml. de cultivo en fase log. tardía de *Rhizobium phaseoli* CE-3 (Noel y cols., 1984). Las plantas fueron crecidas en el invernadero bajo condiciones de luz natural (aproximadamente 14:10 hrs. de ciclo luz:oscuridad) como se describió anteriormente (Ortega y cols., 1986). Fueron regadas cada tercer día con una solución libre de nitrógeno (Broughton y Dilworth, 1971). Bajo estas condiciones, los nódulos son visibles al día 8 pi (post-inoculación con *Rhizobium*) y empiezan a fijar nitrógeno al día 14 pi.

b) COSECHA DE TEJIDOS VEGETALES

Se cosecharon raíces no-infectadas de 7 días y raíces infectadas de 7 y 11 días pi. De todas ellas se tomó la tercera parte superior de la raíz, donde normalmente aparecen los nódulos. Asimismo, se disectaron con pinzas los nódulos de 17 y 21 días pi. Todos estos tejidos se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido con el objeto de preservar el ARN. Después fueron almacenados a -70°C hasta su procesamiento posterior.

c) PURIFICACION DE ARN

La purificación de ARN se hizo siguiendo el método de Guanidina-colchón de cesio (Chirgwin y cols., 1979). El tejido se muele en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta reducirlo a un polvo fino. Se le agregan 2 vols. de una solución de guanidina (Tiocianato de guanidina 4 M., Tris-HCl 50 mM. pH 7.4, EDTA 10 mM. pH 8.0 y β -mercaptoetanol 0.2 % v:v). Se agita muy vigorosamente y se centrifuga por 10 min. a 10 krpm. para remover los restos celulares. El sobrenadante se extrae con una mezcla de fenol:cloroformo 50:50 y se centrifuga de igual manera. Para precipitar los ácidos nucleicos, a la fase acuosa se le añade una tercera parte del volumen de etanol al 100% y se incuba a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifuga por 30 min. a 10 krpm. El botón se seca y resuspende en 2.1 ml. de TE 10:1. Se aplica sobre 3.1 ml. de un colchón de cesio (CsCl 5.7 M., EDTA 100 mM). Se centrifuga por 16 hrs. a 35 krpm. a 20°C. El botón se lava con etanol al 95% y se resuspende en 300 μ l. de TES (Tris-HCl 10 mM. pH 8.0, EDTA 5 mM y SDS 0.1% p:v). A esto se le agregan 30 μ l. de acetato de sodio 3 M. pH 5.2 y 900 μ l. de etanol 100%. Se incuba por 30 min. a -20°C. Al final se centrifuga por 10 min. a 12 krpm. y el botón se lava con etanol al 70%. Se seca el botón y se resuspende en agua libre de ARNasas. Se toma una alícuota para estimar su concentración por medio del espectrofotómetro.

d) PREPARACION DE LA GENOTECA DE ADNc DE RAIZ INFECTADA DE 8 DPI.

La genoteca de ADNc se construyó en el vector pUC-9 siguiendo el método de cebador-adaptador (Sánchez y cols., 1987) a partir de ARN mensajero purificado de la tercera parte superior de las raíces infectadas del día 8 pi. El tamaño promedio de los insertos es de 600 pares de bases.

e) HIBRIDACION DIFERENCIAL

Por medio de cromatografía en columna de oligo-dT celulosa (Jacobson, 1987) se purificó la fracción poli-A⁺ del ARN total proveniente de raíces no infectadas e infectadas de 8 dpi. Se sintetizó la primer hebra de ADNc radioactiva con la siguiente mezcla de reacción: 1 µg. de ARN fracción poli-A⁺, 50 mM. de Tris-HCl pH 8.3, KCl 50 mM., MgCl₂ 10 mM., DTT 1 mM., EDTA 1 mM., BSA 10 µg./ml., 500 ng. oligo-dT₁₂₋₁₈, dATP, dTTP y dGTP 0.1 mM., RNasin 17 unidades, [α -³²P] dCTP 100 µCi y Transcriptasa Reversa AMV 28 unidades. Incubar 20 min. a 42°C. Después se le añade 1 µl. de solución de caza (dATP, dTTP, dGTP y dCTP 10 mM.). Se incuba por otros 40 min. a 42°C.

Se prepararon filtros réplica de la genoteca según el procedimiento reportado (Hanahan y Meselson, 1980). Estos filtros se hibridaron utilizando como sonda el ADNc radioactivo (Maniatis y cols., 1980). Se eligieron 100 colonias que hibridan únicamente con la sonda radioactiva proveniente de raíz infectada. Se repitió el tamizaje por duplicado.

f) ANALISIS DE EXPRESION

El análisis de expresión se realizó por experimentos tipo northern (Maniatis y cols., 1980), fraccionando el ARN total en geles de agarosa al 1.2 ó 1.5% conteniendo 1.11% de formaldehído en MENP 1X (MOPS 20 mM, Acetato de Sodio 5 mM., EDTA 1 mM. y KH₂PO₄ 10 mM. y Na₂HPO₄ 10 mM., pH 6.9). El ARN se transfirió por capilaridad a membranas de nylon (Amersham) usando SSC 20X (NaCl 3 M. y citrato de sodio 0.3 M.). Se corrieron 20 µg. de ARN total por carril. Los filtros se hibridaron contra ADN radiactivo obtenido por medio de "random priming" (Feinberg y Vogelstein, 1983) usando formamida al 50% en la solución de hibridación y los lavados fueron estrictos (SSC 0.1X, SDS 0.1% y a 65° C).

g) PURIFICACION Y TRANSFERENCIA DE ADN GENOMICO

El ADN genómico se purificó a partir de tejido de hoja. El ADN se fraccionó en un gel de agarosa al 0.8% y se transfirió a membranas de nylon siguiendo el método de Southern (Maniatis y cols., 1980). Se hibridó contra una sonda radioactiva obtenida al marcar el inserto de la clona pJMR-17 por medio de "random priming".

h) SECUENCIACION DE ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo por medio del método de los dideoxi-terminadores de cadena (Sanger y cols., 1977), usando el paquete de Sequenase (USB), con ADN de doble cadena y utilizando los "primers" universal y reverso. La secuencia se realizó usando la estrategia que se muestra en la figura 5 haciendo subclonaciones en los vectores pUC-19 (Yanish-Perron y cols., 1985) y pKS (Stratagene). Además, se sintetizaron dos oligonucleótidos con la secuencia 5'-GACCTTCATGATGCT y 5'-GTTCCAACAACAACT, que reciben el nombre de JMR-1 y JMR-2, respectivamente.

i) ANALISIS DE LA SECUENCIA DE ADN

El análisis de la secuencia se realizó por medio de los siguientes programas: Seqaid, PC-Gene (Intelligenetics, Inc), Martínez y GCG-Wisconsin (Devereux y cols., 1984). Se usó el programa FASTA (Lipman y Pearson, 1985) para hacer comparaciones de las secuencias obtenidas contra las secuencias contenidas en las bases GENBANK (release 63.0; 3/90) y EMBL (release 22.0: 2/90), empleando una computadora Digital Equipment Corporation (DEC) VAX/VMS 5.0.

RESULTADOS

a) AISLAMIENTO DE CLONAS DE NODULINAS TEMPRANAS DE FRIJOL.

El tamizaje de genotecas de ADNc por medio de hibridación diferencial es una técnica muy poderosa para aislar genes que se expresan de una manera tejido-específica o en diferentes estadios de desarrollo de un mismo tejido (StJohn y Davis, 1979).

Se usó esta técnica para aislar clonas de ADNc que contenían secuencias de nodulinas tempranas de frijol. A partir de una genoteca de ADNc obtenida de raíces 8 días pi (post-inoculación con *Rhizobium*) compuesta por 1,500 colonias se aislaron 100 posibles clonas que hibridaron específicamente con el ADNc radioactivo sintetizado a partir de ARN mensajero de raíces infectadas de 8 días. El tamizaje se repitió por duplicado obteniendo 12 clonas cuyos nombres así como el tamaño de los insertos que contienen se muestran en la Tabla II. De las 12 clonas, tres presentan dos fragmentos al liberar el inserto del vector con las enzimas Eco-RI y Hind-III (pJMR-39, -69 y -80) lo cual indica que poseen un sitio interno reconocido por alguna de las enzimas mencionadas.

Para descartar aquellas clonas que fueran similares a la nodulina temprana *Enod2* reportada con anterioridad, se realizó un Southern de los insertos de las clonas contra la clona 2pH2, que contiene la región codificadora de esa nodulina de soya (Franssen y cols., 1987). Ninguna de las 12 clonas presenta semejanza a esta nodulina temprana (datos no mostrados).

Se escogió a la clona pJMR-17 para estudiar su expresión puesto que siendo una de las más grandes era probable que contuviera completa la región codificadora del mensajero del que se sintetizó.

b) EXPRESION DE LA CLONA pJMR-17.

Con objeto de conocer en que etapa de la nodulación se expresa el mensajero homólogo a esta clona, se realizó un experimento tipo northern con ARN totales obtenidos de raíces no infectadas de 7 días e infectadas de 7 y 11 días pi, además de nódulos de 17 y 21 días pi. Se cargaron 20 µg. de ARN total por carril y se hibridó contra el inserto marcado radioactivamente de la clona pJMR-17. No se detecta señal en el carril de raíz no infectada. La señal empieza a ser visible en el correspondiente a raíz de 7 días pi, es muy notoria en raíz de 11 días pi y permanece a ese nivel en nódulos de 17 y 21 días pi. En todos los casos se observan dos bandas de 1.45 y 1.17 Kb. Este patrón de expresión nos indica que estos mensajeros codifican para una nodulina del tipo temprano. (ver figura 2).

El mismo filtro se hibridó contra clones de otras dos nodulinas, la temprana Enod2 (Franssen y cols., 1987) y la tardía Npv-30 de frijol que es homóloga en ciertos dominios a la familia de nodulinas a la que pertenece la N-23 de soya (Campos y cols., 1987), con objeto de comparar su expresión con la de la clona pJMR-17. Se observa que Enod2 se expresa desde el 7º día pi, aumentando su nivel al 11º día pi y se mantiene constante de ahí en adelante (ver figura 3). El tamaño del mensajero es de aproximadamente 1.2 kb. En cuanto a la expresión de Npv-30, se le empieza a ver al día 11 pi, aumentando al día 17 pi para después permanecer a ese nivel hasta el día 21 pi. El tamaño de este mensajero es de 0.9 kb (ver figura 3). El patrón de expresión de la clona pJMR-17 es similar al de la nodulina temprana Enod-2. Se debe hacer notar que para observar la señal de la Npv-30 bastaron 30 min. de exposición del film, para ver la de Enod-2 se requirió de toda una noche mientras que para la clona pJMR-17 se expuso el film durante una semana. Esto nos indica que su nivel de expresión es más bajo que el de los mensajeros de Enod-2 y Npv-30.

c) EL GENE DE LA CLONA pJMR-17 SE ENCUENTRA REPRESENTADO EN UN BAJO NUMERO DE COPIAS EN EL GENOMA DE FRIJOL

Para conocer el número de copias en el genoma de frijol de las secuencias homólogas a la clona pJMR-17 se hizo un experimento tipo Southern. Se corrieron dos carriles con ADN de hoja de frijol digerido con las enzimas de restricción Eco-RI y Hind-III. En ambos carriles se observa una banda prominente de 3 kb. y 23 kb. respectivamente (ver figura 4), lo que sugiere que el gene que dió origen a estos mensajeros se encuentra representado una sola vez en el genoma de frijol.

d) SECUENCIA NUCLEOTIDICA DE LA CLONA pJMR-17.

Para obtener más información acerca de la naturaleza de la nodulina temprana codificada en la clona pJMR-17, se determinó su secuencia nucleotídica.

El inserto de la clona de ADNc se sometió a un análisis de restricción con el objeto de conocer los sitios internos que nos sirvieran para construir las subclonas apropiadas en los vectores pUC-19 y pKS (ver figura 5). En todos los casos se secuenciaron las dos cadenas del ADN.

La secuencia nucleotídica de la clona pJMR-17 se muestra en la figura 6. La secuencia es de 1,162 pb, incluyendo una cola de poli-(dA) de 55 residuos. Posee un marco abierto de lectura de 573 bases que finaliza en tres codones de término (TGA). Se observa una secuencia posible de adición de poli-(dA) a partir del nucleótido 1042 (AAATAG).

e) CARACTERISTICAS DE LA PROTEINA CODIFICADA POR LA CLONA pJMR-17.

A partir del marco abierto de lectura, se puede deducir una proteína de 191 aminoácidos, la cual se muestra en la figura 6 debajo de la secuencia nucleotídica y haciendo uso del código de una sola letra para designar a los aminoácidos. El peso molecular calculado del producto de traducción es de 20,856 Dal. y su composición de aminoácidos se presenta en la Tabla III.

Se estudió el perfil de hidropatía de este producto, siguiendo el método de Kyte y Doolittle (1982), usando una ventana de 9 residuos. El perfil obtenido se muestra en la figura 7. En general, la proteína es hidrofílica, a excepción del extremo amino terminal que es altamente hidrofóbico (residuos 1 al 19).

Se buscaron hélices transmembranales usando los métodos de Eisenberg y cols., (1984) y de Rao y Argos (1986), encontrando en ambos casos que el segmento que va del residuo 2 al 26 posee la hidrofobicidad promedio y extensión adecuadas. Esta estructura helicoidal e hidrofóbica en el extremo amino terminal es similar a los péptidos señal encontrados en la mayoría de las proteínas que son secretadas y que sirve para iniciar la exportación a través de la membrana del retículo endoplásmico en eucariotes. Para probar esta hipótesis, se utilizó un programa que predice la posible existencia de un péptido señal en el extremo amino terminal de una proteína. Este programa hace uso del algoritmo diseñado por von Heijne (1986). Dos segmentos de la secuencia obtuvieron una calificación mayor que la mínima (6) y cuyos sitios de corte se encuentran entre las posiciones 24-25 y 25-26 (ver figura 8). El primero obtuvo una calificación de 8.63 y el segundo 7.37. Ambos sitios de corte cumplen con la regla (-3, -1) que establece que el residuo en la posición -1 debe ser pequeño y el de la posición -3 no debe ser aromático, ni cargado o grande y polar. En ninguna de las posiciones se tolera la presencia del aminoácido Prolina. Se considera que el primero es el más probable ya que obtuvo la más alta calificación. En conclusión, existe una gran posibilidad de que en el extremo amino terminal del producto codificado por la clona pJMR-17 se encuentre presente un péptido señal. El peso molecular del producto procesado es de 18,261 Dal. por lo que de acuerdo a la nomenclatura propuesta por van Kammen (1984) se le designará con el nombre de Enodpv-18 (nodulina temprana de *Phaseolus vulgaris* -frijol- de peso molecular 18 KDal.).

Posteriormente, al analizar la secuencia mediante el programa PROSITE (parte del paquete de programas de PCGene) se llevó a cabo una búsqueda de sitios de modificación post-traduccional, secuencias topogénicas, dominios con alguna función biológica definida, sitios activos de enzimas y patrones específicos característicos de una familia o grupo de proteínas. Este análisis reveló lo siguiente:

1) un posible sitio de N-glicosilación en la posición N-42 (Marshall, 1972). El patrón consenso es N-{P}-(S,T)-{P}, que significa: Asparagina-(cualquier aminoácido excepto Prolina (Serina o Treonina))-(cualquier aminoácido excepto Prolina).

2) cuatro sitios probables de fosforilación por proteína cinasa C, en las posiciones S-28, S-68, S-154 y T-172 (Kishimoto y cols., 1985; Kemp y Pearson, 1990). El patrón consenso es (S,T)-X-(R,K), siendo S o T el sitio de fosforilación y X cualquier aminoácido.

3) tres sitios posibles de fosforilación por caseína cinasa II, en las posiciones S-51, S-88 y T-155 (Marín y cols., 1986). El consenso es (S,T)-X-X-(E,D), donde S o T son el sitio de fosforilación.

Todos estos sitios se indican en la secuencia de aminoácidos de Enodpv-18 en la figura 9.

Se debe hacer notar que la presencia de los sitios susceptibles a ser modificados en la secuencia de aminoácidos de la Enodpv-18 no es suficiente para concluir que *in vivo* tales residuos se encontrarán modificados, por lo cual debe verificarse experimentalmente su existencia.

También se comparó la estructura de este péptido con el de proteínas regulatorias que se unen a ADN (activadores o represores eucarióticos) sin encontrar alguna similitud.

Reichsteiner y cols. (1987) han lanzado la hipótesis de que las secuencias de aminoácidos de proteínas con una vida media menor de 2 horas contienen una o varias regiones ricas en Prolina (P), ácido glutámico (E), Serina (S), Treonina (T), y en un menor grado, ácido aspártico. Esas regiones, llamadas regiones PEST están flanqueadas por residuos positivos. En la proteína Enodpv-18 se encontró una región PEST que inicia en la posición 38 y termina en el residuo 55, lo que sugiere que posiblemente este producto tenga una vida media corta, aunque esto último falta corroborarlo experimentalmente.

f) COMPARACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA Y DE AMINOACIDOS DE Enodpv-18 CONTRA LAS BASES DE GENES GENBANK Y EMBL.

Por medio del programa FASTA (Lipman y Pearson, 1985) se buscaron en las bases de genes GenBank y EMBL secuencias similares a la secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la Enodpv-18. El resultado de esta búsqueda fué negativo. Además, se comparó la secuencia de aminoácidos de la proteína Enodpv-18 con las secuencias recientemente reportadas de las nodulinas tempranas Enod-5, Enod-3 y -14 y Enod-12 (Scheres y cols., 1990a y b) sin encontrar alguna semejanza estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que la Enodpv-18 es una nodulina no descrita con anterioridad.

g) ESTRUCTURA SECUNDARIA de Enodpv-18.

Se utilizaron dos tipos de métodos de predicción para reconstruir la estructura secundaria de la proteína Enodpv-18. Los estados conformacionales resultantes se muestran en la figura 10.

El método GOR (Garnier y cols., 1978) distingue cuatro posibles estados: H (hélice), E (extendida), T (vuelta) y C (estructura al azar), mientras que el nuevo método GGBSM (Gascuel y Golmard, 1988) sólo predice hélices, estructuras extendidas y al azar. Si se sobreponen las dos predicciones, aquellas que sean idénticas se consideran más confiables desde el punto de vista estadístico. En caso de desacuerdo, se le da preferencia a los estados predichos por el método GGBSM debido a que la desviación promedio de sus predicciones respecto a estructuras conocidas es menor que la del método GOR. Según el método GGBSM, el 27% de los residuos tiene una estructura de hélice, el 29% está en una conformación extendida y el resto no posee ninguna de las conformaciones anteriores.

DISCUSION

La formación de nódulos en las raíces de las leguminosas puede verse como un proceso de diferenciación vegetal y como tal tiene la ventaja sobre otros sistemas en que el programa de desarrollo está inducido por la interacción con el *Rhizobium*, del cual contamos con cepas que presentan mutaciones en diversos genes que causan defectos en el referido programa, facilitando la identificación y el análisis de los pasos sucesivos que se requieren para la formación de esta estructura.

La expresión de las nodulinas (las proteínas codificadas por el genoma vegetal que se inducen durante la simbiosis) no sólo es específica de este órgano, sino que se regulan durante el desarrollo. Una clase de nodulinas se expresa al comienzo del desarrollo (las nodulinas tempranas) las cuales probablemente estén involucradas en los procesos de infección por el *Rhizobium*, en la transducción de señales emitidas por la bacteria y en aspectos estructurales de la ontogénesis del nódulo. Una segunda clase (las nodulinas tardías) se expresan en un estadio posterior y participan en el funcionamiento del nódulo (facilitan la fijación del nitrógeno e intervienen en la asimilación del amonio).

Dada la importancia que tienen las nodulinas tempranas durante la morfogénesis del nódulo (debido a que están directamente involucradas en este proceso) y a la falta de estudios sobre estas proteínas en la simbiosis frijol-*Rhizobium phaseoli*, decidimos enfocarnos a su estudio.

Usando el método de hibridación diferencial en colonia aislamos 12 clonas que se expresan específicamente en raíces de 8 días pi y que no se expresan en raíces del mismo estadio que no fueron infectadas (Tabla II). Esto nos indicó que para observar la expresión de estos mensajeros se requiere que la raíz de la leguminosa interactúe con la bacteria, por lo que es muy probable que estas clonas codifiquen para nodulinas tempranas.

En un experimento tipo Southern y con el objeto de saber si estas clonas muestran similitud al ADnc de la nodulina temprana Enod-2 y poder descartar aquellas que sean semejantes, se hibridaron los insertos de las 12 clonas contra una clona que contiene la región codificadora del gene de Enod-2. Ninguna de las clonas hibridó contra Enod-2 por lo que pensamos que no se encuentra una secuencia similar en el conjunto de 12 clonas.

Se escogió a la clona pJMR-17 para continuar con su caracterización debido a que contiene uno de los insertos más grandes. Se observó mediante experimentos tipo northern la presencia de dos mensajeros de 1.45 y 1.17 Kb. los cuales se expresan a un nivel similar durante el desarrollo del nódulo. Como puede observarse en la figura 2 esta clona codifica para una nodulina temprana, puesto que se expresa durante las primeras etapas del desarrollo del nódulo y no se expresa en ARN

proveniente de raíces no infectadas. Este patrón de expresión es similar al de otras nodulinas tempranas (Franssen y cols., 1987; Scheres y cols., 1990a). El mensajero de esta nodulina es apenas detectable en raíces al 7½ día pi, aumenta su expresión al día 11 pi manteniéndose constante hasta el día 21 pi, a diferencia de Enod-12 que se expresa transitoriamente alcanzando su máximo entre los días 10 y 13, para disminuir al día 17 pi. En este sentido se parece a las nodulinas tempranas Enod-2, Enod-14 y Enod-3 que son visibles a partir del día 10 pi, aumentando su expresión al día 13 para mantenerse constantes hasta el día 17 pi (Scheres et al, 1990b).

Por el momento en que se observa la expresión de esta nodulina, es posible que esté involucrada en la morfogénesis del nódulo o en la infección de las células vegetales por la bacteria. Una manera de conocer en cual de los dos procesos interviene es inocular las raíces del frijol con una cepa de *Rhizobium* mutante que forme nódulos vacíos. Si se expresa esta nodulina temprana en presencia de la mutante se puede concluir que tiene un papel en la morfogénesis y en el caso contrario podría estar participando durante la infección.

En el northern se observan dos bandas de igual intensidad, sin embargo en la hibridación tipo Southern de ADN genómico de hojas de frijol digerido con las enzimas de restricción EcoRI y Hind-III, se observó una banda prominente en ambos casos. Desconocemos el mecanismo que origina los dos transcritos pero es posible que existan modificaciones post-transcripcionales como un "splicing" diferencial, una degradación específica o por diferencias en las longitudes de la cola de poli-(dA).

La obtención de la secuencia nucleotídica de la clona pJMR-17 nos permitió predecir algunas propiedades de la proteína que codifica. Tiene un peso molecular de 20,856 Dal. y su composición de aminoácidos se muestra en la tabla III.

Dadas las características mostradas en el análisis de hidrofobicidad (figura 7) podemos especular sobre su posible localización subcelular:

Una posibilidad es que el péptido señal presente en el extremo amino-terminal sea funcional pudiendo ser exportado ya sea hacia afuera de la célula (como en el caso de las nodulinas tempranas reportadas que presentan un péptido señal y se encuentran formando parte de la pared celular) (Franssen y cols., 1987; Scheres y cols., 1990 a y b) o hacia el espacio peribacteroidal (atravesando la membrana peribacteroidal) y que ahí se encuentre como una proteína globular.

La otra posibilidad es que el péptido señal no sea funcional; en tal caso puede pensarse que el segmento hidrofóbico presente en el extremo amino terminal pudiera permitirle a esta proteína anclarse en alguna membrana.

El péptido presenta algunos sitios posibles de modificación post-traduccionaI como son la N-glicosilación y la fosforilación por proteína cinasa C y por caseína cinasa II. En todos los

organismos se ha documentado la fosforilación de proteínas (y la desfosforilación) como uno de los mecanismos más importantes para regular diferentes procesos celulares como son la actividad de varias enzimas y la expresión genética de numerosos genes (Kemp y Pearson, 1990). Se puede especular sobre la posible función de esta nodulina temprana proponiendo:

a) que posea una actividad enzimática que sea regulada por medio de fosforilación, o bien,

b) que sea un receptor de membrana cuya afinidad por su ligando sea modificada por medio de fosforilación.

Para apoyar las anteriores posibilidades podemos decir que en plantas encontramos varios ejemplos de enzimas que son reguladas por fosforilación como la piruvato deshidrogenasa y la quinato-NAD⁺ oxidoreductasa (Rubin y Randall, 1977; Refeno y cols., 1982; Ranjeva y Boudet, 1987); la fosforilación del complejo de clorofila a/b que a su vez regula la transferencia de energía entre los fotosistemas (Bennet y cols., 1980); cambios específicos en la fosforilación de proteínas durante el desarrollo de frutos de tomate (*Raghothama* y cols., 1985) y de los tumores inducidos por el *Agrobacterium tumefaciens* (Arfmann y Willmitzer, 1982; Kahl y Schfer, 1984); al nivel de la expresión genética, la acción de algunos factores nucleares que actúan en *trans* como el elemento CREB (cAMP response element-binding protein) y un factor de stress de calor son regulados por fosforilación (Yamamoto y cols., 1988; Sorger y Pelham, 1988). Además, en extractos de núcleos de células provenientes de nódulos se ha reportado la existencia de actividades fosforilativas con características bioquímicas semejantes a las de la proteína cinasa I y la caseína cinasa II (Suzuki y Verma, 1989), por lo que podemos pensar que existan enzimas similares en otros compartimientos subcelulares que podrían fosforilar a la nodulina temprana Enodpv-18.

Se puede especular sobre la participación de las proteínas cinasas en la nodulación debido a que en plantas varias de estas enzimas se encuentran asociadas a la membrana plasmática, en una posición que les permite transducir una gran cantidad de señales de fuera de la célula (Ranjeva y Boudet, 1987). Esto les confiere una gran importancia en el intercambio de señales que se da a todo lo largo del desarrollo y funcionamiento del nódulo.

Es muy importante saber si la Enodpv-18 es susceptible de ser fosforilada, lo cual puede probarse experimentalmente sobreexpresando la proteína en *E. coli*, purificándola a homogeneidad e incubándola con extractos de células de nódulo en presencia de ³²P-ATP y observar si se le incorpora la radioactividad.

La obtención de la secuencia nucleotídica también nos permitió compararla contra las secuencias reportadas de otras nodulinas tempranas y tardías, encontrando que no se parece significativamente a ninguna de ellas. También pudimos comparar tanto la secuencia nucleotídica como la secuencia de aminoácidos predicha contra las bases de genes de Genbank, EMBL y Swiss-Prot con el objeto de buscar aquellos genes o proteínas que sean similares (en toda la extensión o en dominios determinados) que nos pudiera dar una idea de la posible función de la proteína Enodpv-18. En este caso la búsqueda también tuvo un resultado

negativo. Esto nos indica que se trata de una secuencia que no ha sido reportada con anterioridad.

Es muy importante hacer notar que la posible función de todas las nodulinas tempranas reportadas hasta ahora es de tipo estructural y es probable que formen parte de la pared celular de la célula vegetal (Franssen y cols., 1987; Scheres y cols., 1990a y b). Se puede pensar que deben existir nodulinas tempranas con otro tipo de funciones como por ejemplo la regulación genética de la división celular inducida en la corteza de la raíz, la regulación de la expresión genética de otras nodulinas, la transducción de señales provenientes de la bacteria (receptores celulares y proteínas regulatorias asociadas, receptores de fitohormonas y proteínas involucradas en la generación de segundos mensajeros) y algunas enzimas (por ejemplo de la síntesis de fosfolípidos necesarios para producir la gran cantidad de membranas peribacteroidales que se requieren). Dado que la proteína Enodpv-18 no presenta semejanza a ninguna de las nodulinas tempranas reportadas con anterioridad, surge la posibilidad de que su función no sea la de una proteína estructural y si alguna de las antes mencionadas.

Es necesario hacer estudios más detallados para conocer su localización en el nódulo por medio de hibridación *in situ* y el tipo de células en las que se expresa y si el producto es modificado por fosforilación, así como el origen de los dos transcritos.

También resultará interesante saber si se expresa en otros tejidos de la planta (como en tallo, hoja o flor) como se ha visto en el caso de las "nodulinas" GS y Enod-12. También si esta nodulina es particular del frijol o se expresa en otras leguminosas.

Por último, es necesario recordar que de las 12 clonas que se aislaron sólo se estudió en profundidad la pJMR-17. Las 11 restantes pudieran contener secuencias interesantes por lo que es importante caracterizarlas.

El estudio de las nodulinas (sus genes, su expresión y su función) sin duda nos permitirá conocer algunos de los eventos más fundamentales de la biología vegetal a nivel molecular.

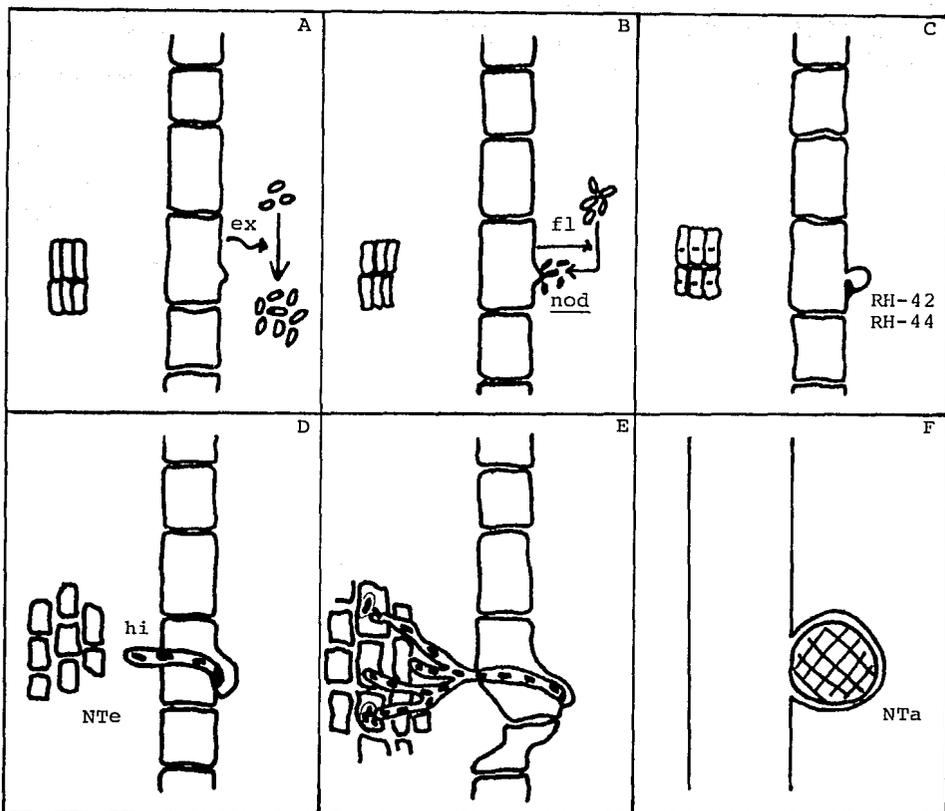


FIGURA 1. Representación esquemática de la infección de los pelos radiculares de las leguminosas por *Rhizobium* y la formación de un nódulo fijador de nitrógeno. A) Colonización de la superficie radicular facilitada por la liberación de exudados orgánicos (ex) por parte de la planta. B) Pre-infección: los compuestos flavonoides (fl) excretados por las raíces inducen la expresión de los genes *nod* de *Rhizobium*. C) Infección: deformación de los pelos radiculares causada por el factor de nodulación e inducción de las proteínas RH-42 y RH-44 de los pelos radiculares. D) Formación del primordio y crecimiento del hilo de infección (hi), expresión de las nodulinas tempranas (NTe). E) Liberación de las bacterias dentro de la célula vegetal donde son rodeadas por la membrana peribacteroidal. F) Funcionamiento del nódulo: fijación de nitrógeno y expresión de las nodulinas tardías (NTa).

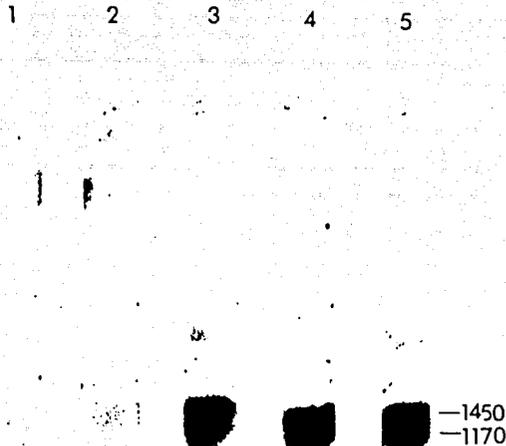


FIGURA 2. Expresión de la clona pJMR-17 durante el desarrollo de nódulos de frijol. El ARN se purificó de raíces no-infectadas de 7 días (carril 1), raíces infectadas de 7 y 11 días post-inoculación (carriles 2 y 3, respectivamente) y nódulos de 17 y 21 días pi (carriles 4 y 5, respectivamente). Se separaron 20 μ g. de ARN total en un gel de agarosa al 1.5% y se transfirió a filtros de nylon. Las condiciones de hibridación y lavado fueron estrictas. El film se expuso por una semana.



FIGURA 3. Expresión de los genes Enod-2 y Npv-30 durante el desarrollo de nódulos de frijol. Se usó el mismo filtro de figura anterior, previamente lavado y checado. Se hibridó en condiciones estrictas contra: panel A) Enod-2 (clona2pH2p) y panel B) Npv-30. En el caso de Enod-2 el film se expuso toda la noche mientras que en el de Npv-30 bastaron 30 minutos.

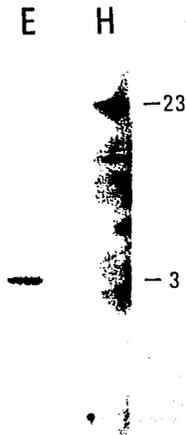


FIGURA 4. Hibridación del inserto de la clona pJMR-17 contra ADN total de hoja de frijol. El ADN fue digerido con las enzimas de restricción Eco-RI (E) y Hind-III (H) y transferido a nylon. Se muestran los tamaños calculados de las bandas predominantes.

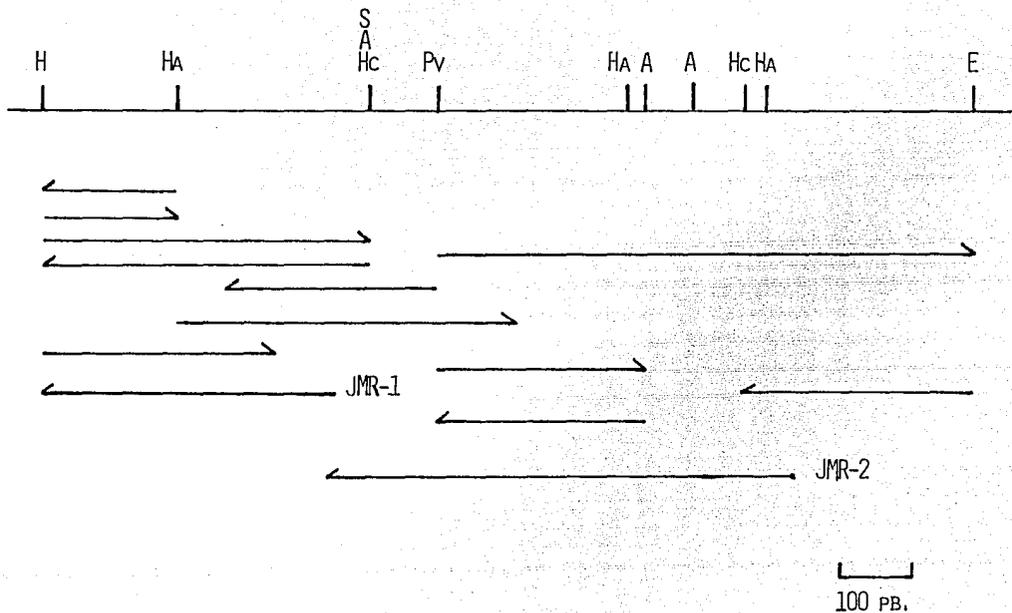


FIGURA 5. Mapa de restricción de la clona pJMR-17. Debajo se muestran las subclonas que se utilizaron para obtener la secuencia nucleotídica indicando la dirección en la que se realizó la secuencia. También se muestra la localización de los dos oligonucleótidos usados (JMR-1 y JMR-2). H=Hind-II, HA=Hae-III, S=Sal I, A=Acc-I, HC=Hinc-II, PV=Pvu-II y E=Eco-RI. Los sitios Eco-RI y Hind-III pertenecen al vector pUC-9.

V	V	V	V	V	V		
GGTTATGGTGGTGGTAGACTTGTGCTTGTACAGTGATGATGAAGGAATGAGTGGTGAGTA							859
G	Y	G	G	G	R	L	V
						L	V
						Q	*
						*	*
							191
V	V	V	V	V	V	V	
ACGAATGATTCTTTTGTAACTTCATGTTGCCCTCCAAACGTGGCCATATTAGTATGTTG							919
V	V	V	V	V	V	V	
GTTAGATTTCAAGTTGTTGTTGGAACTAGTTTCTCTGTGAATTTTATTGTTGCTATTGTT							979
V	V	V	V	V	V	V	
GAATCAGGAACAAAAATGTTCTATCTGGACAATGGTTTATTCATGGCAATGGCAATTTTC							1039
V	V	V	V	V	V	V	
<u>GTA</u> AATAGGTGTAACCTCTGTTTCGTGTGTTCTTTTATTGCTCAGATAACTCTGTTCATGA							1099
V	V	V	V	V	V	V	
GATTGTTTAAA							1159
V							
AAA	1162						

FIGURA 6. Secuencias nucleotídica y de aminoácidos deducida del inserto de la clona pJMR-17. Debajo de la secuencia nucleotídica se muestra la secuencia de aminoácidos usando el código de una sola letra. Los codones de término se señalan con * * * y la secuencia posible de adición de poli-(dA) se muestra subrayada.

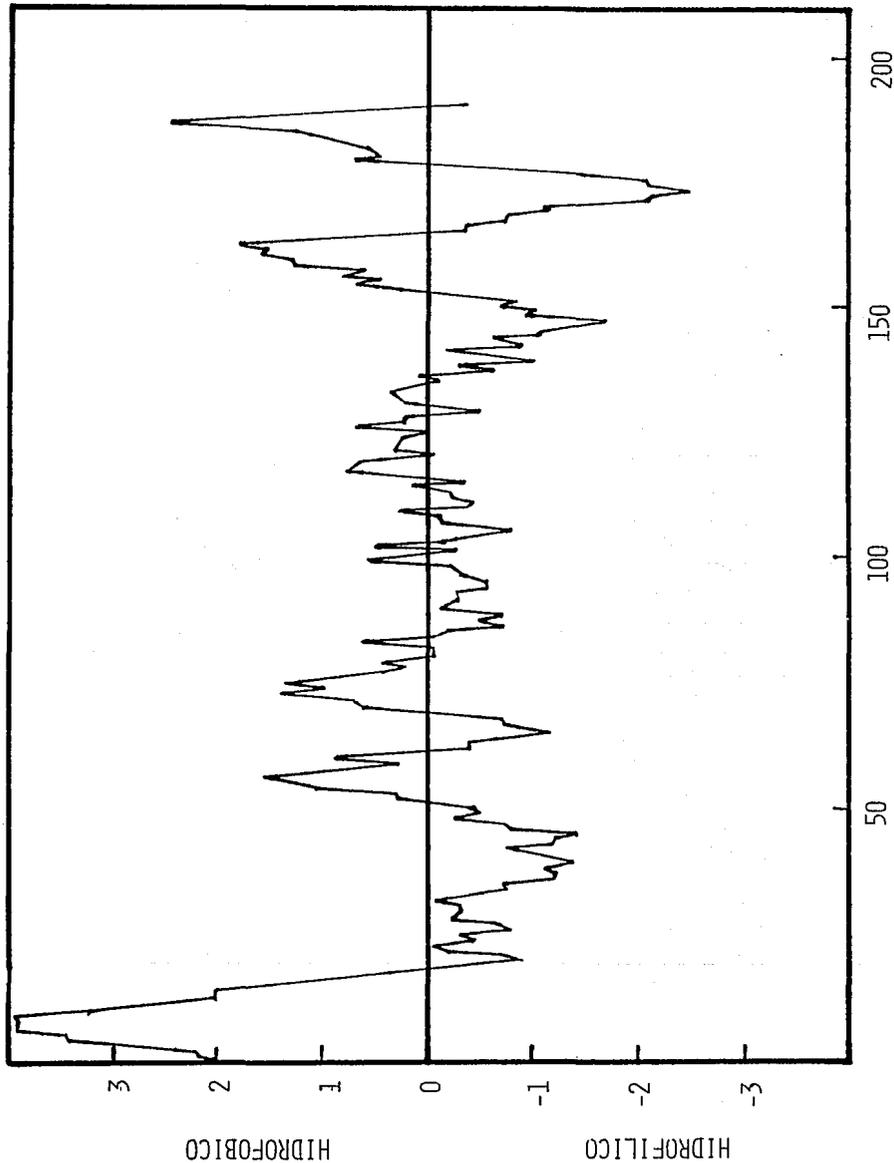


FIGURA 7. Perfil de hidropatía de la proteína deducida de la secuencia nucleotídica de la clona pJMR-17. El análisis se realizó por medio del algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) usando una ventana de 9 residuos.

(1)

El sitio potencial de corte está entre la posición A-24 y A-25.

La calificación de este sitio es: 8.63

Secuencia:

M i q k v s l i f i v i i a v l i l v l q s s a : A F H

(2)

El sitio potencial de corte está entre la posición A-25 y F-26.

La calificación de este sitio es: 7.37

Secuencia:

M i q k v s l i f i v i i a v l i l v l q s s a a : F H S

FIGURA 8. Secuencias de los péptidos señal y sus posibles sitios de corte predichos por el programa de von Heijne (1986). La calificación mínima para un resultado significativo es de 6. Se muestran las porciones de la secuencia de aminoácidos que tuvieron una calificación mayor. Ambos sitios se ajustan a la regla (-3,-1).

1 Met-Ile-Gln-Lis-Val-Ser-Leu-Ile-Pen-Ile-Val-Ile-Ile-Ala-Val-
 *
 16 Leu-Ile-Leu-Val-Leu-Gln-Ser-Ser-Ala-Ala-Pen-His-Ser-Ser-Lis-
 !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!\$!!!!!!!!!!!!!!
 31 Asn-Ser-Ile-Met-Lis-Val-His-Pro-Val-Pro-Glu-Asn-Ala-Tre-Ser-
 !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!#!!!!!!!!!!!!!!
 46 Gln-Ser-Asn-Ser-Ala-Ser-Tre-Gli-Glu-Ser-His-Val-Gli-Ala-Gln-
 *
 61 Ala-Leu-Leu-Gli-Ile-Ala-Gli-Ser-Lis-Lis-Leu-Arg-Arg-Leu-Pro-
 #
 76 His-Val-Pen-Ser-Cis-Val-Leu-Glu-Leu-Pro-Pen-Arg-Ser-Asp-Ala-
 91 Asp-Val-Val-Val-Glu-Glu-Asp-Pro-Asp-Cis-Pen-Arg-Pen-Val-Ala-
 106 Glu-Tre-Glu-Gli-Ile-Gli-Asp-Val-Arg-Ala-His-Tre-Ile-Glu-Ile-
 121 His-Pro-Gli-Val-Tre-Lis-Ile-Val-Val-Arg-Asp-Gli-Gli-Ser-Val-
 136 Glu-Leu-Ser-Leu-Asp-Gln-Leu-Glu-Leu-Asp-Met-Trp-Arg-Pen-Arg-
 * #
 151 Leu-Pro-Glu-Ser-Tre-Arg-Pro-Glu-Leu-Ala-Ser-Ala-Val-Pen-Val-
 *
 166 Asp-Gli-Glu-Leu-Ile-Val-Tre-Val-Arg-Arg-Gln-Glu-Arg-Lis-Tre-
 181 Gli-Tir-Gli-Gli-Gli-Arg-Leu-Val-Leu-Val-Gln

FIGURA 9. Posibles sitios de modificación post-traducciona en la secuencia de aminoácidos de la proteína Endopv-19 predichos por el programa PROSITE del paquete PC-Gene. Los aminoácidos modificables se indican con los siguientes símbolos: \$ para la N-glicosilación; * para la fosforilación por proteína cinasa C; # para la fosforilación por caseína cinasa II. Con el signo !! se señala la región PEST encontrada en esta proteína.

30

M	I	Q	K	V	S	L	I	F	I	V	I	A	V	L	I	L	V	L	Q	S	S	A	A	F	H	S	S	K	
[
[GOR
[GGBSM

PEPTIDO
SEÑAL

60

N	S	I	M	K	V	H	P	V	P	E	N	A	T	S	Q	S	N	S	A	S	T	G	E	S	H	V	G	A	Q	
T	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	GOR
C	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	GGBSM

90

A	L	L	G	I	A	G	S	K	K	L	R	R	L	P	H	V	F	S	C	V	L	E	L	P	F	R	S	D	A	
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	GOR
H	H	H	H	H	C	C	H	H	H	H	H	H	C	C	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	GGBSM

120

D	V	V	V	E	E	D	P	D	C	F	R	F	V	A	E	T	E	G	I	G	D	V	R	A	H	T	I	E	I	
H	E	E	E	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	GOR
H	E	E	E	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	GGBSM

150

H	P	G	V	T	K	I	V	V	R	D	G	G	S	V	E	L	S	L	D	Q	L	E	L	D	M	W	R	F	R	
Ē	C	T	C	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	C	GOR
Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	GGBSM

180

L	P	E	S	T	R	P	E	L	A	S	A	V	F	V	D	G	E	L	I	V	T	V	R	R	Q	E	R	K	T	
C	C	T	C	C	C	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	GOR
Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	GGBSM

191

G	Y	G	G	G	R	L	V	L	V	Q	
T	T	T	T	C	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	GOR
Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	Ē	GGBSM

FIGURA 10. Estructura secundaria de la proteína Enodpv-19 predicha por los métodos de Garnier, Osguthorpe y Robson (GOR) y de Gascuel y Golmard (GGBSM). Se muestra en la primera línea la secuencia de aminoácidos de la proteína, en la segunda la estructura predicha por GOR y en la tercera la correspondiente a GGBSM. Los cuatro posibles estados de la proteína se designan como H (hélice), E (cadena extendida), T (vuelta) y C (espiral). Aquellas porciones de 5 o más residuos consecutivos que se encuentran en la misma conformación se muestran con una raya encima del residuo.

NODULINAS TEMPRANAS

NOMBRE	PROCESO EN EL QUE INTERVIENE	ORIGEN	ESTRUCTURA
RH-44	DEFORMACION DEL PELO RADICULAR	CHICHARO	?
RH-42	ENROSCAMIENTO DEL PELO RADICULAR	CHICHARO	?
ENOD-2	MORFOGENESIS DEL NODULO	SOYA	PROTEINA RICA EN HIDROXI-PROLINA
ENOD-13	MORFOGENESIS DEL NODULO	SOYA	PROTEINA RICA EN HIDROXI-PROLINA
ENOD-12	INFECCION	CHICHARO	PROTEINA RICA EN HIDROXI-PROLINA
ENOD-55	INFECCION	SOYA	RICA EN PROLINA Y SERINA
ENOD-5	CELULAS INFECTADAS	CHICHARO	SEMEJANTE A LAS ARABINOGALACTANAS
ENOD-3	CELULAS	CHICHARO	CONTIENE 4 CISTEINAS QUE PODRIAN UNIR METALES (Fe o Mo).
ENOD-14	INFECTADAS		

TABLA 1. Características de las nodulinas tempranas reportadas hasta ahora.

NOMBRE DE LA CLONA	TAMAÑO
pJMR - 93	0.30
pJMR - 78	0.30
pJMR - 20	0.40
pJMR - 18	0.45
pJMR - 54	0.65
pJMR - 76	0.70
pJMR - 88	0.70
pJMR - 69*	0.75
pJMR - 80*	0.90
pJMR - 27	0.90
pJMR - 17	1.16
pJMR - 39*	1.20

TABLA II. Nombre de las doce clonas de ADNC que hibridaron específicamente con raíz infectada de 8 días pi y tamaño del inserto que contienen (en Kilobases). Las clonas marcadas con un asterisco son las que presentan dos fragmentos al liberar el inserto con una doble digestión Eco-RI y Hind-III.

Aminoácido	número	moles %
Ala	13	6.81
Cis	2	1.05
Asp	9	4.71
Glu	14	7.33
Fen	8	4.19
Gli	14	7.33
His	6	3.14
Ile	13	6.81
Lis	7	3.66
Leu	19	9.95
Met	3	1.57
Asn	3	1.57
Pro	8	4.19
Gln	7	3.66
Arg	13	6.81
Ser	18	9.42
Tir	1	0.52
Tre	8	4.19
Trp	1	0.52
Val	24	12.57

Número total de residuos : 191

Peso molecular : 20,856.40

TABLA III. Composición de aminoácidos de la proteína codificada por la clona pJMR-17, expresada como moles %.

BIBLIOGRAFIA

Appleby, CA. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 433-478.

Arfmann, HD and Willmitzer, L. (1982). Endogenous protein kinase activity of tobacco nuclei. Comparison of transformed, non-transformed cell cultures and the intact plant of *Nicotiana tabacum*. *Plant Sci. Lett.* 26: 31-38.

Baker, ME and Saier, MH. (1990). A common ancestor for bovine lens major intrinsic protein, soybean nodulin-26 protein, and *E. coli* glycerol facilitator. *Cell* 60: 185-186.

Bennet, J, Steinback, KE and Arntzen, CJ. (1980). Chloroplast phosphoproteins: regulation of excitation energy transfer by phosphorylation of thylakoid membrane polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 5253-5257.

Bennet, MJ, Lightfoot, DA, and Cullimore, JV. (1989). cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase γ polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 12: 553-565.

Bergamann, H, Preddie, E, and Verma, DPS. (1983). Nodulin-35: a subunit of nodule-specific uricase (uricase II) induced and localized in uninfected cells. *EMBO J.* 2: 2333-2339.

Broughton, WJ. and Dilworth, MJ. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* 125: 1075-1080.

Caetano-Anoles, G., Crist-Estes, DK., and Bauer, WD. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bact.* 170: 3164-3169.

Campos, F., Padilla, J., Vazquez, M., Ortega, JL., Enriquez, C., and Sanchez, F. (1987). Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9: 521-532.

Chirgwin, JM, Przybyla, AE, McDonald, RJ, and Rutter, WJ. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 24: 5294-

Delauney, A. y Verma, DPS. (1988). Cloned nodulin genes for symbiotic nitrogen fixation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 6: 279-285.

Devereux, J., Haeberli, P, and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12: 387-395.

Diaz, CL, Melchers, LS, Hooykaas, PJJ, Lugtenberg, BJJ and Kijne, JW. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* 338: 579-581.

Eisenberg, D., Schwarz, E., Komarony, M., and Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179: 125-142.

Feinberg, AP. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.

Forde, BG, Day, HM, Turton, JF, Wen-ju, S, Cullimore, JV, and Oliver, JE. (1989). Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L. display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *The Plant Cell.* 1: 391-401.

Forde, BG, Freeman, J. Oliver, JE, and Pineda, M. (1990). Nuclear factors interact with conserved A/T rich elements upstream of a nodule-enhanced glutamine synthetase gene from french bean. *The Plant Cell.* 2: 925-929.

Fortin, MG, Zelechowska, M, and Verma, DPS. (1985). Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. *EMBO J.* 4: 3041-3046.

Fortin, MG, Morrison, NA, and Verma, DPS. (1987). Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucl. Acids Res.* 15: 813-824.

Franssen, HJ., Nap, J-P., Gloudemans, T., Stiekema, W., van Dam, H., Govers, F., Louwerse, J., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1987). Characterization of cDNA for nodulin-75 of soybean: a gene product involved in early stages of root nodule development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4495-4499.

Franssen, HJ, Scheres, B, van de Wiel, C, and Bisseling, T. (1988). Characterization of soybean (hydroxy)proline-rich early nodulins. In: Palacios, R. and Verma, DPS. (eds.) *Molecular Genetics of Plant-microbe interactions.* APS Press, St. Paul. pp. 163-178.

Franssen, HJ, Thompson, DU, Idler, K, Kormelink, R, van Kammen, A, and Bisseling, T. (1989). Nucleotide sequence of two soybean ENOD2 early nodulin genes encoding Ngm-75. *Plant Mol. Biol.* 14: 103-106.

Fuller, F., Kunstner, PW., Nguyen, T., and Verma, DP. (1983). Soybean nodulin genes: analysis of cDNA clones reveals several major tissue specific sequences in nitrogen fixing root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2594-2598.

Garnier, J, Osguthorpe, DJ, and Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120: 97-120.

Gascuel, O. and Golmard, JL. (1988). A simple method for predicting the secondary structure of globular proteins: implications and accuracy. *CABIOS* 4: 357-365.

Gloude-mans, T., de Vries, S., Bussink, H-J., Malik, NSA., Franssen, HJ., Louwerse, J., and Bisseling, T. (1987). Nodulin gene expression during soybean (*Glycine max*) nodule development. *Plant Mol. Biol.* 8: 395-403.

Gloude-mans, T., Bhuvan-eswari, TV., Moerman, M., van Brussel, T., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1989). Involvement of *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes in gene expression in pea root hairs. *Plant Mol. Biol.* 12: 157-167.

Govers, F., Gloude-mans, T., Moerman, M., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1985). Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *The EMBO J.* 4: 861-867.

Gresshoff, PM., Day, DA., Delves, AC., Mathews, A., Olsson, JA., Price, GD., Schuller, KA., and Carroll, BJ. (1985). Plant host genetics of symbiotic nitrogen fixation and nodulation in pea and soybean. In: Evans, HJ., Bottomley, PJ. and Newton, WE. (eds). *Nitrogen Fixation Research Progress*, pp. 19-25. Dordrecht, Nijhoff Publ.

Gresshoff, PM. and Delves, AC. (1986). Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: Blonstein, AD., King, PJ. (eds). *A genetic approach to plant biochemistry*. Plant Gene Research. pp. 159-206. Springer-Verlag, Wien, New York.

Hanahan, D. and Meselson, M. (1980). Plasmid screening at high colony density. *Gene* 10: 63-67.

Hirsch, AM., Bhuvan-eswari, TV., Torrey, JG., and Bisseling, T. (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1244-1248.

Hoo-ykaas, PJJ, Ledeb-er, AM, Wikijne, J, Schilperoot, RA, Nuti, MP, Lepidi, AA, Case, F, Bouchar, C, Julliot, JS, and Denari, J. (1978). Detection, isolation and characterization of large plasmids in *Rhizobium*. In: Evans, HJ, Bottomley, PJ, and Newton, WE (eds.) *Nitrogen Fixation Research Progress*. Martinus Nijhoff Publishers.

Jacobs, FA, Zhang, M, Fortin, MG, and Verma, DPS. (1987). Several nodulins of soybean share structural domains but differ in their subcellular locations. *Nucl. Acids Res.* 15: 1271-1280.

Jacobsen, K, Laursen, NB, Jensen, E, Marcker, A, Poulsen, C, and Marcker, KA. (1990). HMGI-like proteins from leaf and nodule nuclei interact with different AT motifs in soybean nodulin promoters. *The Plant Cell* 2: 85-

Jacobson, A. (1987). Purification and fractionation of poly-A⁺RNA. In: Berger, SL and Kimmel, AR. (eds). *Methods in Enzymology* vol. 152. "Guide to molecular cloning techniques". pp. 254-261. Academic Press, Inc. NY.

Jensen, E., Marcker, KA., Schell, J., and de Bruijn, FJ. (1988). Interaction of a nodule specific, trans-acting factor with distinct DNA elements in the soybean leghaemoglobin *lbc3* 5' upstream region. *The EMBO J.* 7: 1265-1271.

Jrgensen, JE, Stougaard, J, Marcker, A. and Marcker, KA. 1988. Root nodule-specific gene regulation: analysis of the soybean nodulin N23 gene promoter in heterologous symbiotic systems. *Nucleic Acids Res.* 16: 39-50.

Kahl, G and Schfer, W. (1984). Phosphorylation of chromosomal protein changes during the development of crown gall tumours. *Plant Cell Physiol.* 25: 1187-1196.

Katinakis, P. and Verma, DPS. (1985). Nodulin-24 gene of soybean code for a polypeptide of the peribacteroid membrane and was generated by tandem duplication of a sequence resembling an insertion element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 4157-4161.

Kemp, BE and Pearson, RB. (1990). Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends in Biochem. Sci.* 15: 342-346.

Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y., and Nishizuka, Y. (1985). Studies on the phosphorylation of myelin-basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 260: 12492-12499.

Kyte, J. and Doolittle, RF. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.

Lara, M, Cullimore, JV, Lea, PJ, Mifflin, BJ, Johnston, AWB, and Lamb, C. (1983). Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during the nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157: 254-258.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Proni, JC., and Denari, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.

Lipman, DJ. and Pearson, WR. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227: 1435-1441.

Long, SR. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. Cell 56: 203-214.

Long, SR. and Cooper, J. (1988). Overview of symbiosis. In: Palacios, R. and Verma, DPS. (eds). Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. APS Press, St. Paul.

Lullien, V., Barker, DG., de Lajudie, P., and Huguet, T. (1987). Plant gene expression in effective and ineffective root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). Plant Mol. Biol. 9: 469-478.

Maniatis, T., Fritsch, EF., and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. CSH Laboratory.

Marin, O., MEggio, F., Marchiori, F., Borin, G., and Pinna, LA. (1986). Site specificity of casein kinase-2 (TS) from rat liver cytosol. A study with model peptide substrates. Eur. J. Biochem. 160: 239-244.

Marshall, RD. (1972). Glycoproteins. Ann. Rev. Biochem. 41: 673-702.

Martínez, E, Romero, D. and Palacios, R. (1990). The *Rhizobium* genome. Critical Reviews in Plant Sciences 9: 59-93.

Metz, BA, Welter, P, Hoffmann, HJ, Jensen, E, Schell, J. and de Bruijn, F. (1988). Primary structure and promoter analysis of leghemoglobin genes of the stem-nodulated tropical legume *Sesbania rostrata*: conserved coding sequences, cis-elements and trans-acting factors. Mol. Gen. Genet. 214: 181-191.

Mifflin, BJ. and Lea, PJ. (1980). Ammonia assimilation. In: Mifflin, BJ. (ed.) The Biochemistry of plants. Academic Press, NY. pp. 169-202.

Moerman, M, Nap, JP, Govers, F, Schilperoort, R, van Kammen, A. (1987). *Rhizobium nod* genes are involved in the induction of two early nodulin genes in *Vicia sativa* root nodules. Plant Mol. Biol. 9: 171-179.

Nap, J-P. and Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. Science 250: 948-954.

Newcomb, W., Sippel, D., and Peterson, RL. (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. Can. J. Bot. 57: 2603-2616.

Nguyen, T, Zelechowsk, MG, Foster, V, Bergmann, H, and Verma, DPS. (1985). Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding nodule specific uricase localized in peroxisomes of uninfected cells of soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 5040-5044.

Noel, KD, Sánchez, F, Fernández, L, Leemans, J and Cevallos, MA. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn-5 insertions. J. Bact. 158: 148-155.

Norris, JH, Macol, LA, Hirsch, AM. (1988). Nodulin gene expression in effective alfalfa nodules and in nodules arrested at three different stages of development. *Plant Physiol.* 88: 321-328.

Ortega, JL., Campos, F., Sánchez, F., and Lara, M. (1986). Expression of two different Glutamine Synthetase polypeptides during root development in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 80: 1051-1054.

Padilla, JE, Campos, F, Conde, V, Lara, M. and Sánchez, F. (1987). Nodule specific glutamine synthetase is expressed before the onset of nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 9: 65-74.

Padilla, J, Miranda, J and Sánchez, F. (1991). Nodulin regulation in common bean nodules induced by bacterial mutants. Enviado para su publicación.

Ranjeva, R. and Boudet, AM. (1987). Phosphorylation of proteins in plants: regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 38: 73-93.

Rao, MJK., and Argos, P. (1986). A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 869: 197-214.

Raghothama, KG, Veluthambi, K and Poovaiah, BW. (1985). Stage-specific changes in calcium-regulated protein phosphorylation in developing tomato fruits. *Plant Cell Physiol.* 26: 1565-1572.

Refeno, G, Ranjeva, R, Delvare, S and Boudet, AM. (1982). Modulation of quinate:NAD oxidoreductase through reversible phosphorylation in carrot cell suspensions. *Planta* 154: 193-198.

Reichsteiner, M., Rogers, S., and Rote, K. (1987). Protein structure and intracellular stability. *Trends in Biochem. Sci.* 12: 390-394.

Rolfe, BR. and Gresshoff, PM. (1988). Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant Physiol. & Plant Mol. Biol.* 39: 297-319.

Rubin, PM and Randall, DD. (1977). Regulation of plant pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation. *Plant Physiol.* 60: 34-39.

Sánchez, F., Campos, F., Padilla, J., Bonneville, JM., Enriquez, C., and Caput, D. (1987). Purification, cDNA cloning, and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 84: 1143-1147.

Sandal, NN, Bossen, K, and Marcker, K. (1987). A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucl. Acids Res.* 15: 1507-1519.

Sandal, NN. and Marcker, KA. (1988). Soybean nodulin-26 is homologous to the major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane. *Nucl. Acids Res.* 16: 9347.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, AR. (1977). Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Scheres, B., van de Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaik, H., van Eck, H., Zwartkruis, F., Wolters, A-M., Gloudemans, T., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1990a). The *Enod12* gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction.

Scheres, B., van Engelen, F., van der Knapp, E., van de Wiel, C., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1990b). Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule.

Schubert, KR. (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 539-574.

Sorger, PK and Pelham, HRB. (1988). Yeast heat-shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54: 855-864.

StJohn, TP. and Davis, RW. (1979). Isolation of galactose-inducible DNA sequences from *Sacharomyces cerevisiae* by differential plaque filter hybridization. *Cell* 16: 443-453.

Stougaard, J., Marcker, KA., Otten, L., and Schell, J. (1986). Nodule-specific expression of a chimaeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* 321: 669-674.

Stougaard, J., Sandal, NN, Groon A, Khle, A, and Marcker, KA. (1987). 5' analysis of the soybean leghaemoglobin *lbc3* gene: regulatory elements required for promoter activity and organ specificity. *EMBO J.* 6: 3565-3569.

Stougaard, J, Jrgensen, JE, Christensen, T, Khle, A. and Marcker, KA. (1990). Interdependence and nodule specificity of *cis*-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and *N23* gene promoters. *Mol. Gen. Genet.* 220: 353-360.

Suzuki, H. and Verma, DPS. (1989). Nodule-specific kinases phosphorylating nuclear factors in isolated nuclei. *The Plant Cell* 1: 373-379.

Thummler, F. and Verma, DPS. (1987). Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthetase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* 262: 14730-14736.

Tran Thanh Van, K, Toubart, P, Cousson, A, Darvill, AG, Collin, DJ, Chelf, P, and Albersheim, P. (1985). Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature* 314: 615-617.

van de Wiel, C., Scheres, B., Franssen, H., van Lierop, M-J., van Lammeren, A., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1990a). The early nodulin transcript Enod-2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. The EMBO J. 9: 1-7.

van de Wiel, C, Norris, JH, Bochenek, B, Dickstein, R, Bisseling, T, and Hirsch, AM. (1990b). Nodulin gene expression and Enod-2 localization in effective, nitrogen fixing and ineffective, bacteria-free nodules of alfalfa. The Plant Cell. 2: 1009-1017.

van Holst, G-J., Klis, FM., de Wildt, PJM., Hazenberg, CAM., Buijs, J., and Stegwee, D. (1981). Arabinogalactan protein from a crude cell organelle fraction of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 68: 910-913.

van Kammen, A. (1984). Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. Plant Mol. Biol. Rep. 2: 43-45.

Verma, DPS. and Long, SR. (1983). The molecular biology of the *Rhizobium*-legume symbiosis. Int. Rev. Cytol. Suppl. 14: 211-245.

Verma, DPS. and Delauney, AJ. (1988). Root nodule symbiosis: nodulins and nodulin genes. In: Verma, DPS. and Goldberg, RB. (eds). Plant gene research. Temporal and spatial regulation of plant genes. Springer-Verlag, Wien, New York. pp. 169-199.

Vincent, JM. (1980). Factors controlling the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: Newtonm WE. and Orme-Johnston, WH. (eds). Nitrogen Fixation Research II. University Park Press, Baltimore. pp. 103-129.

von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690.

Yamamoto, KK, Gonzalez, GA, Biggs, WH III and Montminy, MR. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB.

Yanisch-Perron, C, Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33: 103-119.