

03072

2  
2ej

**CARACTERIZACION DE LA REGION DE CONTROL  
DEL GENE DE LA NODULINA 30  
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) EN  
PLANTAS TRANSGENICAS**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA  
PRESENTA**

**CAROLINA CARSOLIO MATA**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**CUERNAVACA, MOR.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**JULIO 10, 1992**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

Resumen	I
Introducción	1
I) Nodulación y fijación de nitrógeno	2
II) Antecedentes históricos	3
III) El nódulo como modelo de estudio	3
IV) Desarrollo del nódulo	3
V) Nodulinas tardías	5
VI) El uso de plantas transgénicas para estudiar la expresión genética	7
Antecedentes	11
I) Nodulina 30	11
II) Análisis de promotores de nodulinas tardías	12
Objetivo y Estrategia Experimental	15
Materiales y métodos	16
I) Material biológico	16
II) Transformación y regeneración de <i>Lotus corniculatus</i>	17
III) Ensayo fluorimétrico	17
IV) Localización histoquímica	17
V) Manipulaciones de DNA	17
VI) Secuencia de DNA	17
VII) Vectores	18
VIII) Hibridación de DNA	18
Resultados	19
I) Obtención de la clona genómica	19
II) Secuencia de DNA	19
II.1) Región codificadora	19
II.2) Región de control	20
III) Construcción de genes quiméricos	21
IV) Transformación de <i>Lotus corniculatus</i>	22
IV.1) Establecimiento del sistema	22
IV.2) Otros sistemas	23
V) Análisis del promotor de N-30 en plantas transgénicas	23
V.1) Análisis fluorimétrico	24
V.2) Análisis histoquímico	24
Discusión	25
I) Secuencia de la región codificadora de N-30	25
II) Expresión de los genes quiméricos en <i>Lotus corniculatus</i>	27
Bibliografía	31

## RESUMEN

Entre las plantas de la familia de las leguminosas y las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*, se establece una relación simbiótica que da como resultado la formación de un nuevo órgano, llamado nódulo. El nódulo se forma en las raíces de las plantas, y su desarrollo es un proceso altamente complejo, que involucra la diferenciación coordinada de ambos simbios. Durante este proceso, se induce la expresión específica de varios genes vegetales y bacterianos. Las proteínas generadas por la expresión de los genes de la planta específicos de nódulo se denominan nodulinas, y de acuerdo a su cinética de aparición, se clasifican como tempranas ó tardías.

La Nodulina 30 (N-30) es una nodulina tardía del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), y fué detectada como el producto de la traducción *in vitro* de un transcrito muy abundante, específico de nódulo. Se desconoce aún el papel de esta proteína *in vivo*.

El objetivo de este trabajo fué realizar un estudio sobre los promotores de los genes de la planta específicos de la nodulación, con la finalidad de aproximarnos a la comprensión de la regulación genética de la misma. Para este fin, se utilizó como modelo el promotor del gene de la N-30. Durante el trabajo experimental de esta tesis, se aisló una clona genómica que codifica para una de las proteínas del grupo de N-30. Al secuenciar la región de control de este gene, se encontraron diferentes motivos que muestran homología con elementos de control ya identificados en los promotores de los genes de otras nodulinas tardías. Estos elementos están involucrados en la regulación nódulo-específica y temporal de sus respectivos genes.

Por otro lado, se construyó un gene quimérico fusionando el promotor de la N-30 a la secuencia codificadora de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Esta construcción fué introducida a *Lotus corniculatus*, usando como vector *Agrobacterium rhizogenes*. Los *Lotus* transgénicos fueron nodulados con *Rhizobium loti*.

El análisis fluorimétrico de los diferentes tejidos de las plantas transformadas con el gene quimérico N30-GUS, mostró que la expresión de GUS dirigida por el promotor de N-30 es específica de nódulo. Además, al hacer el análisis histoquímico de los nódulos transgénicos, se detectó la actividad de GUS sólo en las células infectadas del nódulo.

De acuerdo a la expresión de GUS dirigida en *Lotus corniculatus* por el promotor del gene de N-30, podemos concluir que esta proteína es específica de nódulo, y más particularmente, de células infectadas; y que posiblemente juega un papel importante en el funcionamiento del nódulo.

## INTRODUCCION

### 1) Nodulación y fijación de nitrógeno:

Entre las plantas de la familia *Leguminosae* y las bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, se establece una relación simbiótica que da como resultado la formación de un nuevo órgano, llamado nódulo. Este órgano se forma en las raíces ó tallos de las plantas, y su desarrollo es un proceso altamente complejo que implica la diferenciación de ambos organismos. Tanto en la planta como en la bacteria se induce la expresión de nuevos genes, y consecuentemente la producción de nuevas proteínas. Las de la planta son conocidas como nodulinas y las de la bacteria como bacteroidinas. Las nodulinas son, por definición, proteínas codificadas por la planta que se expresan sólo en los nódulos, y no en las raíces no infectadas u otras partes de la planta huésped (van Kammen, 1984).

El término simbiosis fue introducido por De Bary en 1878, para designar una asociación estable entre dos organismos y benéfica para ambos. En el caso del nódulo, la planta provee a la bacteria de nutrientes y de un microambiente adecuado, tanto para su desarrollo, como para la eficiente fijación de nitrógeno. En este nicho la bacteria prolifera y reduce ó fija nitrógeno atmosférico generando amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), que es asimilado por la planta en compuestos orgánicos. Como consecuencia de esta asociación, la planta deja de depender del nitrógeno presente en el suelo.

La relevancia que tiene este hecho sólo puede ser apreciada al analizar la importancia que tiene el nitrógeno (N) como componente de los seres vivos. Es el cuarto elemento en abundancia en ellos, después del carbono (C), oxígeno (O) e hidrógeno (H), y es indispensable para la formación de proteínas y muchas otras biomoléculas. Aunque es el elemento más abundante en la atmósfera (80%), el nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) sólo puede ser utilizado por las plantas si es reducido a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) ó a nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ). Este tipo de compuestos se encuentra en el suelo solamente en pequeñas cantidades, originados principalmente en la primitiva atmósfera reductora de la Tierra. Además, se producen por fenómenos naturales (incendios, actividad volcánica, relámpagos). Sin embargo, la mayoría del nitrógeno que se encuentra en los seres vivos proviene de la fijación del  $\text{N}_2$  atmosférico a  $\text{NH}_4^+$  realizada por organismos procariotes, que son los únicos seres vivos capaces de llevarla a cabo.

Por estas razones, las plantas que pueden establecer una relación simbiótica con una bacteria fijadora de nitrógeno tienen una gran ventaja selectiva, ya que se vuelven independientes del nitrógeno presente en el suelo (Nap et al., 1990a). Esto

las hace ser típicamente especies "pioneras" en suelos con deficiencia de nitrógeno. Por otro lado, desde el punto de vista agrícola, son cultivos que no necesitan fertilizantes y pueden ser usados como "fertilizadores" naturales en terrenos donde se practica la rotación de cultivos. (Salisbury 1985)

## II) Antecedentes históricos:

Las características especiales de las leguminosas fueron reconocidas desde los tiempos de la antigua Roma, donde ya se practicaba el sistema de rotación de cultivos, usando a las leguminosas como "abono verde" (Nap et al., 1990a). En México ya se conocía esta práctica hace más de 3,000 años.

La familia de las leguminosas (*Leguminosae*), consta de unas 17,150 especies aproximadamente, de las cuales han sido analizadas un 19%, encontrándose nódulos en un 87% de ellas (Sprent, 1990).

A fines del S. XIX se tenían diferentes opiniones sobre la posibilidad de que las plantas fueran capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico. Varios autores trabajaron alrededor de este tema: de Saussure (1804), Boussingault (1854), von Liebig (1860), Frank (1886), Joule (1885), Atwater (1885), etc. En especial, había una fuerte controversia respecto a las capacidades especiales que parecían tener las leguminosas. En 1888 Hellriegel y Wilfarth publicaron el primer trabajo que dio una respuesta clara, y una explicación sobre lo que sucedía con las leguminosas y sus nódulos, apoyada en experimentos científicamente rigurosos (Quispel, 1988). Haciendo balances de nitrógeno de cereales y leguminosas, probaron que éstas utilizaban una fuente extra de nitrógeno, además del provisto en las soluciones nutritivas. Por medio de experimentos de inoculación en arena estéril, usando sobrenadantes de tierra hervidos y sin hervir, verificaron paso a paso el carácter microbiológico y simbiótico de la fijación del nitrógeno en las leguminosas, y el papel de los nódulos en el proceso. (G. Schilling, 1988). Sin embargo, se desconocía aún la identidad del microsimbionte. En el mismo año Beyernick pudo aislar bacterias de nódulos cuya superficie había sido esterilizada, y más tarde (1890), logró hacer nodular raíces de *Vicia faba* inoculándolas con estas mismas bacterias, que denominó *Bacillus radicicola*.

Otros estudios, realizados por Prazmowski (1890), y Nobbe y Hiltner (1893), arrojaron luz sobre la relación entre bacteroides y fijación de nitrógeno, llegando a la conclusión de que la asimilación de nitrógeno está relacionada con la formación de bacteroides dentro de la célula vegetal (Quispel, 1988).

### III) El nódulo como modelo de estudio:

Además de las consideraciones de tipo práctico, el estudio de la nodulación resulta muy atractivo para realizar investigación básica, ya que en el proceso de formación del nuevo órgano se dan varios fenómenos interesantes:

i) Es un órgano que se origina en un meristemo completamente nuevo, inducido por el *Rhizobium*, y es uno de los pocos fenómenos de diferenciación vegetal que pueden ser controlados en situación experimental. Se puede observar la ontogenia del nódulo desde sus comienzos, ya que su desarrollo se inicia a partir de la inoculación, siguiendo después etapas bien definidas a lo largo del tiempo. Esto permite llevar a cabo diferentes estudios sobre los fenómenos morfogenéticos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares que ocurren durante el proceso de la nodulación.

ii) Es un proceso en el que se puede estudiar la relación simbiótica de manera muy fina, tanto a nivel metabólico como molecular, y la expresión genética de ambos simbioses durante la nodulación. La disponibilidad de mutantes, principalmente de *Rhizobium*, ha sido muy valiosa para determinar la temporalidad y distribución espacial de estos procesos. Por otro lado, la posibilidad de obtener leguminosas transgénicas (Petit et al., 1987), ha permitido analizar muy detalladamente la cinética de expresión de los genes vegetales y la respuesta de éstos a las señales de la bacteria.

iii) Es un proceso que nos permite analizar el fenómeno de especificidad bacteria-huésped. Previamente a la nodulación en sí, ya se da una cierta comunicación entre ambos organismos, de tal manera que el microsimbionte reconoce a su huésped específico y viceversa. Este reconocimiento es a nivel molecular, habiendo sido identificados ya algunos de los genes del *Rhizobium* que intervienen en el mismo y los productos involucrados. Sin embargo, todavía no se sabe con precisión cómo es que la planta reconoce estas señales y cómo se transducen para alterar su expresión genética.

### IV) Desarrollo del nódulo:

El desarrollo del nódulo es un proceso que se caracteriza por un complejo intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta, y ha sido descrito como "una secuencia en múltiples etapas de eventos interdependientes" (Vincent, 1980). La nodulación se ha dividido de manera gruesa en tres etapas: i) la etapa de preinfección ó reconocimiento; ii) la infección y organogénesis del nódulo, y iii) el funcionamiento del nódulo (Scheres, 1990).

Incluso antes de que haya un contacto físico entre la planta y la bacteria, se da una comunicación molecular entre los simbioses, que tiene como primer fin el de reconocerse mutuamente. *Rhizobium* es capaz de vivir en vida libre en el suelo independientemente de su relación con la planta. Sin embargo, si la raíz de una leguminosa crece en las cercanías, las bacterias se dirigen preferentemente hacia ella por quimiotaxis, ya que la raíz excreta exudados que contienen compuestos flavonoides atrayentes para ellas. De esta manera las bacterias "colonizan" la rizósfera y se multiplican en ella, manifestándose la especificidad bacteria-huésped desde esta etapa tan temprana, ya que los rhizobia son atraídos preferencialmente hacia las raíces de su huésped específico (Nap et al., 1990a). Para que se dé esta especificidad bacteria-huésped se requiere de una comunicación molecular, que involucra por lo menos dos pasos de intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta. En el primer paso se induce la transcripción de los genes de nodulación bacterianos, denominados genes *nod* (Long, 1989; Spaink et al., 1992). La especificidad de esta inducción involucra a la proteína bacteriana Nod D, que presumiblemente interacciona directamente con los flavonoides de la planta para actuar sobre los genes *nod* (Horvath et al., 1987; Spaink et al., 1987). En el segundo paso, la bacteria produce una ó más señales, codificadas por los genes *nod*, que desencadenan respuestas de la raíz, como la deformación de los pelos radiculares. De alguna manera, se altera también la expresión genética en la misma (Roche et al., 1991a; Spaink et al., 1991). En el caso de *R. meliloti* se ha identificado un lipo-oligosacárido sulfatado (NodRM1), como una señal bacteriana específica de huésped que aparentemente es la responsable de causar estos cambios en la raíz de alfalfa (Lerouge, 1990; Roche et al., 1991b).

Al adherirse las bacterias a las raíces de la planta causando el enroscamiento de los pelos radiculares, se inicia la invasión de la raíz. Los rhizobia penetran a la célula del pelo radicular por medio de una hidrólisis localizada de la pared celular. Por este punto las bacterias entran a la célula, al formarse una invaginación de la membrana celular. Alrededor de ésta se forma una estructura tubular llamada hilo de infección, por deposición de material semejante al de la pared celular (Long, 1989). Al mismo tiempo y antes de ser alcanzadas por el hilo de infección, las células de la corteza de la raíz registran la señal de invasión aparentemente también debido a moléculas bacterianas como NodRM1 (Roche et al. 1991a), y empiezan a dividirse, dando origen a un nuevo meristemo.

Las bacterias se multiplican dentro del hilo de infección, mientras éste atraviesa capas celulares en dirección al primordio del nódulo. Al llegar a la zona de actividad mitótica el hilo de infección se abre y libera las bacterias dentro del citoplasma celular. Las bacterias quedan entonces envueltas en una membrana (m. peribacteroidal), derivada del plasmalema de la célula vegetal (Nap et al., 1990a). Durante el recorrido por el hilo de infección las bacterias se diferencian a bacteroides, que es el estadio en el que viven dentro de la célula. Los bacteroides

carecen de pared externa y tienen motilidad reducida. Una vez que se encuentran dentro de la célula, expresan la capacidad de fijar nitrógeno.

En este momento el desarrollo del nódulo puede seguir dos caminos diferentes, que llevan a formar nódulos con distinta morfología, dependiendo de la especie de planta de que se trate en leguminosas templadas (chicharro, trébol, alfalfa, haba) se forman generalmente nódulos indeterminados, que tienen una forma cilíndrica y un meristemo apical persistente. Esto les permite seguir creciendo y fijando nitrógeno por más tiempo, y el nódulo resultante tiene simultáneamente zonas en diferentes etapas de desarrollo. En contraste, la mayoría de las leguminosas tropicales (frijol, soya, *Vigna* sp) forman nódulos determinados, de forma esférica y con un tiempo de crecimiento y tamaño definidos. En estos nódulos las diferentes etapas de desarrollo se encuentran sólo en una secuencia temporal, siendo su anatomía más definida. Además de las células infectadas, que se van llenando progresivamente de bacteroides, se encuentran dentro del nódulo células no infectadas, que son más pequeñas y están especializadas para la asimilación del nitrógeno fijado. Estos dos tipos de células se encuentran en la parte central, y alrededor de ellas se desarrollan la corteza y la endodermis del nódulo, misma que constituye una barrera impermeable al oxígeno.

#### **V) Nodulinas tardías:**

Las nodulinas son inducidas en etapas específicas a lo largo del proceso de formación del nódulo. Se dividen comúnmente en dos grandes grupos, de acuerdo a su cinética de expresión: las nodulinas "tempranas" y las nodulinas "tardías". Las primeras son expresadas en el inicio del desarrollo del nódulo y podrían estar involucradas en el proceso de infección bacteriana, la deformación de los pelos radiculares, aspectos estructurales y transducción de señales durante la ontogenia del nódulo. Las nodulinas tardías son expresadas en un estado más avanzado del desarrollo, alrededor del momento del inicio de la fijación del nitrógeno y juegan un papel más directo en el funcionamiento del nódulo, como en la fijación y asimilación del nitrógeno, el metabolismo del carbono, el transporte de metabolitos entre el nódulo y la raíz, etc. (de Bruijn et al., 1990).

De entre las nodulinas tardías las mejor caracterizadas y más abundantes son las leghemoglobinas, que constituyen hasta el 25% de la proteína soluble total del nódulo, dándole su característico color rojizo (Nap et al., 1990b). A semejanza de las globinas animales, las leghemoglobinas son hemoproteínas que funcionan como acarreadoras de oxígeno. Regulan la difusión del mismo de modo que se pueda mantener la concentración adecuada para los bacteroides, constituyendo al mismo tiempo una barrera que evita la entrada de un exceso de O<sub>2</sub> (Appleby, 1984). Las leghemoglobinas trabajan a una concentración de O<sub>2</sub> de alrededor de 10 nM (en

nódulos de soya). Esto permite a la nitrogenasa (encargada de fijar el N<sub>2</sub>) funcionar correctamente, dado que ésta funciona a una baja concentración intracelular de oxígeno (Appleby, 1984). En todas las leguminosas estudiadas hasta ahora, se ha encontrado más de una leghemoglobina en el nódulo, las cuales están codificadas por más de un gene (Nap et al., 1990b). Las leghemoglobinas de soya y sus genes, así como su regulación, han sido estudiados extensivamente. Se han identificado cuatro formas principales de leghemoglobina en soya, que se diferencian sólo ligeramente en su composición de aminoácidos, y que están codificadas por una familia multigénica agrupada en dos regiones (Appleby, 1984; Bojsen et al., 1983; Verma et al., 1986). En el caso de *Sesbania rostrata*, que es nodulada tanto en las raíces como en el tallo, se han encontrado siete leghemoglobinas diferentes (Bogusz et al., 1987; Kortt et al., 1987). La diferente afinidad por el O<sub>2</sub> de las distintas leghemoglobinas y su expresión a diferentes tiempos, podrían mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno y explicar esta abundancia de formas (Uheda et al., 1982; Verma et al., 1988).

La segunda proteína en abundancia en el citoplasma de los nódulos de soya es una proteína de 125kDa compuesta por cuatro subunidades de 35kDa denominada nodulina 35, y posteriormente identificada como uricasa II (Legocki et al., 1979; Bergmann et al., 1983). La uricasa II es una enzima clave en la vía biosintética de los uréidos, por medio de la cual se asimila el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en soya y otras leguminosas tropicales, habiendo sido localizada en peroxisomas de células no infectadas (Nguyen et al., 1985). También se ha detectado una uricasa específica de nódulo en frijol (Sánchez et al., 1987). La expresión de uricasa II en soya y frijol no depende de la fijación de nitrógeno, sino que parece estar inducida, al menos en parte, por bajas concentraciones de O<sub>2</sub>; sin embargo, se le considera como una nodulina tardía debido a su cinética de expresión (Larsen et al., 1986; Sánchez et al., 1991).

Otra enzima que se acumula en el nódulo de manera importante es la glutamino sintetasa (GS), encargada de catalizar el primer paso en la asimilación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> generado por la fijación de nitrógeno de los bacteroides. En frijol, *Phaseolus vulgaris*, se induce fuertemente en el nódulo la expresión de *gln-γ*, uno de los genes que codifican para la GS (Lara et al., 1983). El producto de *gln-γ* ha sido clasificado como una nodulina tardía, ya que se induce un poco antes del inicio de la fijación de nitrógeno (Padilla et al., 1987). Aunque inicialmente se pensó que este péptido era estrictamente nódulo-específico (Lara et al., 1983, 1984), se ha detectado mRNA de *gln-γ* a bajos niveles en tallos, peciolas y cotiledones verdes (Bennett et al., 1989a,b). Sin embargo, la distribución de la expresión dirigida por el promotor de *gln-γ*, preferencialmente en células infectadas, es claramente distinta de la de *gln-β*, cuya expresión dentro del nódulo se restringe a los haces vasculares (Forde et al., 1989). Esta expresión nódulo-específica, ó por lo menos altamente inducida, de

uno o más genes de GS, parece ser común entre las leguminosas, habiendo sido también reportada en soya (Sengupta-Gopalan et al., 1986; Hirel et al., 1987), chicharo (Tingey et al., 1987), *Lupinus luteus* (Konieczny et al., 1988) y alfalfa (Dunn et al., 1988).

Finalmente, se ha caracterizado en soya una familia de genes que codifican para varios productos de distinto peso molecular, y que aparentemente tienen diferente localización dentro del nódulo, cuya función aún no ha sido determinada. En conjunto constituyen los segundos transcritos en abundancia en los nódulos maduros, después de los de leghemoglobina (hasta el 6% del mRNA polisomal) (Verma et al., 1988). Las mejor caracterizadas han sido N-20, N-22, N-23, N-26b, N-27 y N-44 (Sandal et al., 1987; Jacobs et al., 1987; Sengupta-Gopalan et al., 1986a). Al secuenciar estas clonas se observaron dos regiones con alta homología (70-90%), separadas por una tercera región que es única para cada nodulina. Las dos regiones conservadas se centran alrededor de cuatro residuos de cisteínas, distribuidos de manera semejante a los dominios que unen metales conocidos como "dedos de zinc" (Sandal et al., 1987). Todas estas nodulinas tienen un posible péptido señal que sugiere que pueden estar en asociación con membranas, aunque esta asociación sólo se ha demostrado para N-23, mientras que N-27 se ha localizado aparentemente en la fracción soluble (Jacobs et al., 1987).

Además se han identificado algunas otras nodulinas tardías, pero que están bastante menos caracterizadas: la sacarosa sintetasa en soya (Thummler et al., 1987); la aspartato amino transferasa en alfalfa (Griffith et al., 1989); N-26 y N-24 en soya (Fortin et al., 1987; Katinakis et al., 1985).

## **VI) El uso de plantas transgénicas para estudiar la expresión genética:**

La expresión de los genes vegetales está regulada de muchas maneras: se induce o reprime, de manera que los genes se expresen en diferente proporción de acuerdo a lo que se requiere en cada célula particular a lo largo del tiempo. Entre los genes vegetales cuya expresión regulada ha sido más estudiada se encuentran dos grandes grupos: los genes inducibles por estímulos cambiantes y los tejido específicos. Los genes inducibles pueden responder a distintos estímulos como a la luz, la temperatura, al estrés anaeróbico, a heridas, patógenos, señales rhizobiáceas, ritmos circadianos, etc. Además pueden ser inducidos en etapas específicas del desarrollo. Los genes tejido específicos pueden ser activados en tejido verde, tubérculos, semillas, flores, polen, nódulos, etc. (Benfey et al., 1989).

Se ha encontrado que el control de la expresión de los genes está mediado por secuencias determinadas en las regiones 5' y/o 3' de los mismos (elementos de

control en *cis* ). En la mayoría de los casos estudiados hasta ahora se ha visto que este control es a través de proteínas regulatorias que se unen al DNA, influyendo en la activación ó represión transcripcional de los genes (elementos activadores en *trans* ).

El estudio de los elementos *cis* involucrados en la regulación de genes en plantas se ha beneficiado mucho con la posibilidad de transformar plantas genéticamente, es decir de hacer plantas transgénicas (Schell et al.,1987). Durante años recientes se han desarrollado varios métodos para hacer de la transformación vegetal un procedimiento de rutina. La técnica más utilizada para obtener plantas transgénicas hace uso de dos vectores genéticos naturalmente dirigidos a las plantas, las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski et al.,1983; Herrera-Estrella et al.,1983) y *A. rhizogenes* (Chilton et al.,1982; David et al.,1984; Tepfer, 1984). Estas bacterias son capaces de introducir segmentos específicos del DNA (T-DNA) de un plásmido, al genoma de la célula vegetal. Un segundo sistema, más parecido a los utilizados para transformar células animales, es la introducción directa del DNA a protoplastos vegetales, por ejemplo por electroporación, tratamiento con polietilén-glicol (Willmitzer, 1988), ó bombardeo con microprojectiles recubiertos de DNA (Davey et al., 1989; Klein et al., 1987). Sin embargo, la obtención de plantas transgénicas con estos métodos no ha sido tan exitosa como con *Agrobacterium*, y su utilidad se ha limitado principalmente a estudios de expresión transitoria (aunque se han obtenido algunos éxitos con el método de microroyectiles, generando individuos transgénicos estables de soya y maíz) (McCabe et al.,1988; Gordon-Kamm et al.,1990).

El desarrollo de genes quiméricos ha constituido una herramienta muy útil para el uso de plantas transgénicas en estudios de regulación genética. Para realizar estos estudios normalmente se construyen *in vitro* genes quiméricos compuestos de las regiones 5' y/ó 3' del gene que se está estudiando, fusionadas a la secuencia codificadora de un gene "reportero", cuya expresión es fácil de detectar. Como genes reporteros se usan, por ejemplo, el de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), el de la neomicina fosfotransferasa (NPT), ó el de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Estas construcciones son insertadas en el T-DNA de un vector de *Agrobacterium*, cerca de un marcador seleccionable. Los vectores compuestos son entonces introducidos en *A. tumefaciens* ó *A. rhizogenes*, y las bacterias ya transformadas son utilizadas para infectar plantas ó explantes. A partir de los tejidos transformados se regeneran plantas transgénicas. En el caso de genes inducibles, las plantas transgénicas ó tejidos transformados son expuestos entonces al agente inductor, y la actividad del gene reportero es medida. En el caso de genes tejido-específicos, la expresión del gene reportero es analizada en dichos tejidos u órganos, en etapas de desarrollo definidas (de Bruijn et al,1990).

Los elementos regulatorios en *cis* se pueden identificar llevando a cabo un análisis de delecciones de la región promotora y/o fusionando distintos fragmentos de la misma a elementos "potenciadores" de la expresión ("enhancers"). De manera semejante se puede fusionar un promotor mínimo, junto con un gene reportero, a diferentes segmentos de la región regulatoria en estudio, detectando así secuencias que dirigen la expresión órgano-específica, "enhancers", cajas de respuesta a estímulos (luz, ABA, temperatura), etc. Estos análisis se pueden acoplar también a la búsqueda de elementos *trans*, buscando complejos de DNA-proteína por medio de geles de retardamiento, ó viendo si hay alguna zona de DNA protegida usando análisis de EXO III ó ensayos de "foot-printing" (de Bruijn et al,1990).

Para hacer este tipo de análisis con los promotores de nodulinas, fué necesario desarrollar métodos de transformación de plantas leguminosas. El primer protocolo desarrollado fué el de la transformación de *Lotus corniculatus* mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. *Lotus* es una leguminosa usada como forraje que es nodulada por *Rhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. *Lotus* (Petit et al.,1987). Esta combinación fue elegida para estudios de transformación debido a la capacidad de las raíces transformadas, inducidas por el *A. rhizogenes*, de generar espontáneamente brotes en presencia de luz (de Bruijn et al.,1990). Con este sistema se pudieron obtener plantas transgénicas en unos 5-6 meses, encontrándose que alrededor del 90% de las plantas contenían efectivamente la nueva información genética, en este caso el gene químico (*lbc3 5'3'-CAT*) (Petit et al.,1987; Stougaard et al.,1987a). Además, las plantas transgénicas son noduladas normalmente por *Rhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. *Lotus*, y los nódulos resultantes parecen ser funcionalmente equivalentes a los nódulos de raíces no transformadas (Petit et al.,1987). Un segundo procedimiento desarrollado a partir de éste, pero considerablemente más corto, fué reportado por Hansen et al. (1989). En este método también se infectan las plántulas con *A. rhizogenes* y se generan raíces transgénicas "velludas", que no son separadas del tallo. El sistema radicular normal de la planta es eliminado y lo suplen las raíces transformadas, que son directamente noduladas con *R. loti*, en vez de pasar por todo el ciclo de regeneración. La actividad del gene reportero es analizada directamente en estos nódulos.

En el protocolo inicial se usaron vectores cointegrados (Hooykas,1989) para introducir los marcadores seleccionables y los genes químicos al T-DNA de *A. rhizogenes* (Stougaard et al.,1986,1987a). Sin embargo también se han usado vectores binarios (Hooykas,1989; Bevan, 1984) y se ha encontrado que los marcadores contenidos en ellos se co-transfieren con el RiT-DNA a una frecuencia de 10-80% (Stougaard et al.,1987a; Forde et al.,1989; Szabados et al.,1990).

Otras leguminosas que puede ser transformadas son: alfalfa (*Medicago sativa*) (Simons et al.,1988; Deak et al.,1986); soya (*Glycine max*)(Hinchee et

al.,1988; McCabe et al. 1988); frijol (*Phaseolus vulgaris*) (McClellan et al.,1991; Mariotti et al.,1989); chícharo (*Pisum sativum*) (de Katheren et al.,1990; Puonti-Kaerlas et al., 1989); *Vicia narbonensis* (Pickardt et al. 1991); *Vigna aconitifolia* (Eapen et al.,1987); *Vigna unguiculata* (García et al.,1986); *Phaseolus coccineus* (Mariotti et al., 1989) y trébol blanco (*Trifolium repens*) (White et al.,1987). Pero en la mayoría de estos sistemas no ha sido posible la regeneración de las transformantes, ó sólo a una baja eficiencia, lo cuál los hace inútiles como sistemas de análisis confiables y reproducibles (Potrikus, 1991).

Uno de los hechos que se ha puesto de manifiesto utilizando algunos de estos sistemas de transformación, es que aparentemente las señales de expresión para distintas nodulinas están conservadas entre las diferentes leguminosas. Por un lado, hay varios promotores de nodulinas que han dirigido la expresión correcta de sus genes reporteros en *Lotus corniculatus*, tanto organo-específica como temporalmente. Ejemplo de éstos son los promotores de *lbc3* y N-23 de soya (Stougaard et al.,1986,1987b; Jorgensen et al. 1988); el de *glb3* de *S. rostrata* (Metz et al.,1988; Szabados et al.,1990), y el de *gln-γ* de frijol (Forde et al.,1989)]. El promotor de N-23 de soya también funcionó correctamente en el sistema *Trifolium repens+R.trifolii* (Stougaard et al. 1987a) y el promotor de *lbc3* en *Medicago sativa* (Schell et al.,1988; Simons et al.,1988).

Además, se han encontrado factores nucleares, tanto de soya como de frijol, que unen secuencias ricas en A/T y que aparentemente tienen características comunes. El factor nuclear de frijol (PNF-1), aparte de unirse a varias regiones del promotor de *gln-γ* de frijol, también se une a secuencias del promotor de *lbc3* de soya, y parece estar muy relacionado con el factor nuclear de soya NAT-2 (Forde et al.,1990; Jensen et al.,1988; Jacobsen et al.,1990) Todo esto sugiere que por lo menos parte de los mecanismos de control de la expresión de las nodulinas tardías se asemeja entre distintas especies de leguminosas.

## ANTECEDENTES

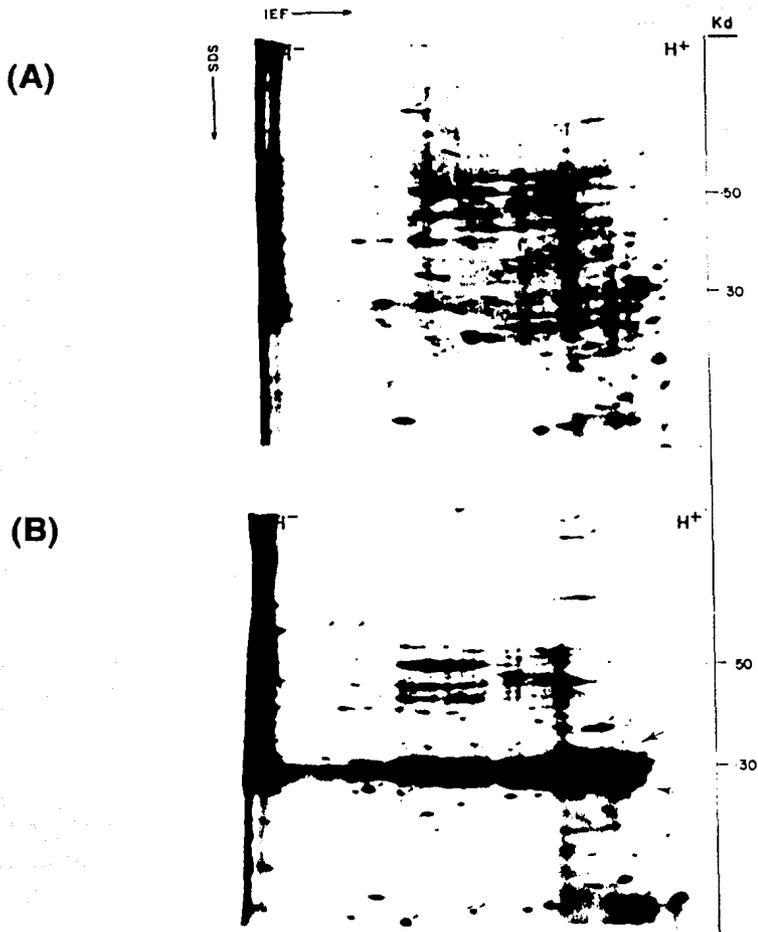
### I) Nodulina 30:

La Nodulina 30 (N-30) es una nodulina tardía del frijol (*P. vulgaris*). Fué detectada como el producto de la traducción *in vitro* de un transcrito muy abundante en el nódulo, y que no se encuentra en la raíz. En un gel de doble dimensión, esta proteína no se enfoca en el gradiente isoeléctrico, por lo que en vez de resolverse como una mancha discreta, se aprecia como un barrido de un peso de alrededor de 30 KD, en el que se distinguen tres zonas (Figura 1) (Campos et al., 1987). La intensidad relativa de estas zonas cambia durante el desarrollo del nódulo maduro. Hasta ahora no se ha encontrado *in vivo* ningún polipéptido tan abundante, que pudiera corresponder a esta(s) proteína(s). Esto puede deberse a que sufren modificaciones postraduccionales y/o tienen tiempos de vida media muy cortos.

La cinética de expresión de N-30 se asemeja a la de otras nodulinas tardías de frijol, como uricasa II y leghemoglobina, apareciendo alrededor del día 11 después de la infección y aumentando gradualmente. A diferencia de éstas, cuya expresión disminuye hacia el día 28, la de la N-30 se mantiene alta. Además, se sabe que la expresión de N-30 requiere de la presencia de *Rhizobium* dentro del nódulo, ya que en nódulos vacíos (sin células infectadas) generados con tres diferentes mutantes de *Rhizobium*, no se expresa N-30 (Padilla et al., 1991).

Haciendo una hibridación diferencial en la que se usaron como sondas cDNA de nódulo y cDNA de raíz no infectada, se obtuvieron varias clonas de cDNA específicas de nódulo. Estas se utilizaron para seleccionar mRNAs por hibridación. El mRNA seleccionado (1200pb) por una de ellas, al ser traducido, produjo una proteína con la migración característica del grupo de N-30, pero que no cubre toda la zona en el gel (Campos et al., 1987). Esta clona de cDNA se usó también para hibridar contra mRNA polisomal y se observó que daba señal con varios transcritos. Además, se usó como sonda en un Southern de DNA genómico de frijol, en el que hibridó con 7 bandas (Campos et al., en preparación). Estos datos, junto con la migración aberrante de la N-30 y su aparente separación en distintas zonas (cuya intensidad cambia durante el desarrollo del nódulo), sugieren que los polipéptidos observados como el grupo de N-30 podrían estar codificados por una familia multigénica (Campos et al., 1987).

Posteriormente se aislaron otras clonas de cDNA para N-30, dos de ellas bastante largas (pN311, 920pb; pN307, 900pb), que fueron usadas en este trabajo. La secuencia de estas clonas se realizó durante el transcurso del mismo (Campos et al., en preparación).



**Figura 1:** (A) Gel de doble dimensión de productos de traducción *in vitro* de RNA polisomal de raíz no infectada de frijol.  
(B) Gel de doble dimensión de productos de traducción *in vitro* de RNA polisomal de nódulo de frijol (18 días). El grupo de N-30 se aprecia como una mancha alargada, señalada aproximadamente a los 30kD. (Tomado de Campos et al., 1987).

No se encontraron, por hibridación con DNA genómico, genes semejantes ni en soya ni en chícharo, usando condiciones de hibridación que detectan un 85% de homología (Campos, comunicación personal).

## II) Análisis de promotores de nodulinas tardías:

Se han aislado ya varios genes de nodulinas tardías, cuya cinética de expresión es semejante, induciéndose fuertemente alrededor del momento del inicio de la fijación de nitrógeno en el nódulo. Este comportamiento sugiere que los mecanismos y secuencias que controlan la expresión de estos genes pueden estar conservados entre ellos (Jorgensen et al., 1991; Stougaard et al., 1990; Szabados et al., 1990). Se han analizado ya, usando diferentes estrategias, las regiones de control de los genes de diferentes nodulinas tardías, y se han delimitado distintos elementos de control en las mismas. También han sido identificadas algunas secuencias consenso que parecen estar involucradas en la expresión órgano-específica de estas proteínas, y otras que unen factores protéicos nucleares de nódulo y de hoja.

De entre los genes de nodulinas tardías, el promotor más estudiado ha sido el del gene *lbc3*, que codifica para una leghemoglobina de soya. Se han llevado a cabo experimentos de deleciones para disectarlo y encontrar los elementos *cis* involucrados en su regulación. En este promotor se encontraron dos elementos positivos (uno fuerte SPE y uno débil WPE), un elemento negativo (NE), y un elemento órgano-específico (OSE) (Figura 12). Dentro de éste último están contenidas dos secuencias cortas que parecen ser específicas de nódulo (CTCTT Y AAAGAT) (Figura 13a) (Stougaard et al., 1987b, 1990).

En otros promotores analizados, el de *Srgl3* (también leghemoglobina) de *Sesbania rostrata* (Szabados et al., 1990; Metz et al., 1988; Welters et al., 1989), y el del gene de N-23 de soya (Jorgensen et al., 1988; Stougaard et al., 1990; de Bruijn et al., 1990), se ha encontrado un patrón semejante de distribución de elementos de control, aunque sin el elemento negativo (Figura 12). Las secuencias órgano-específicas consenso (CTCTT Y AAAGAT) se encuentran también en estos promotores en la región proximal, así como en otros promotores de nodulinas de los que sólo se conoce la secuencia (Figura 13a). Sin embargo, al analizar por deleciones el promotor de *Srgl3* de *S. rostrata*, la región del mismo homóloga al OSE (en donde se encuentran estas secuencias), no se comportó como un elemento específico de nódulo, aunque la expresión del gene si lo es. Este dato sugiere que hay otras regiones involucradas en el control de la expresión órgano-específica (Szabados et al., 1990; de Bruijn et al., 1990). Por ejemplo, el elemento positivo más fuerte (SPE) del promotor de *lbc3* parece estar involucrado en un control

nódulo-específico, ya que además de comportarse como un "potenciador" (enhancer) (dado que también funciona en la posición invertida), es capaz de dirigir una expresión específica de nódulo en ausencia del OSE; pero no hay ningún factor nuclear que se una *in vitro* a DNA en esta zona, ni se han encontrado secuencias consenso al compararlo con otros promotores, por lo que no se puede saber qué secuencias son responsables de estas funciones (Stougaard, 1990).

En el caso del promotor de N-23 se han encontrado, además de un elemento OSE funcional, dos elementos positivos (PE-A y PE-B) que funcionan juntos como un "enhancer" específico de nódulo (Jørgensen et al., 1991) (Figura 12). Ambos contribuyeron de manera equitativa en la inducción de la expresión de CAT bajo el promotor de N-23, como se concluyó al observar una expresión similar de los genes quiméricos al deletar ya sea uno ó el otro de los dos elementos de la construcción. Al disectar más finamente esta región, se demostró que los responsables de la función de los elementos positivos son dos repetidos invertidos InvA e InvB de 12pb cada uno (Figura 12). Ni estas secuencias, ni otros repetidos invertidos semejantes, han sido encontradas en otros promotores de nodulinas, y no tienen relación a nivel de secuencia con el SPE de *lbc3* (Jørgensen et al., 1991).

En cuanto a las secuencias relacionadas con unión a proteínas, se encontraron originalmente dos regiones ricas en A/T (BS1 y BS2) en el promotor de *lbc3* de soja que unen un factor protéico específico de nódulo (Jensen et al., 1988ab; de Bruijn et al., 1988) (Figura 12). Un análisis comparativo con el promotor de *Srglb2* de *Sesbania*, reveló que en él existe un sitio de unión análogo y en una posición similar, que interactúa con el mismo factor de soja. Además, hay sitios múltiples más arriba en el promotor que también se unen a él (Metz et al., 1988; de Bruijn et al., 1988). Más adelante se aisló este factor, denominándose NAT2, y se encontraron varios sitios de unión en el promotor de N-23 (Jacobsen et al., 1990). Se identificaron otros dos factores nucleares de soja que se unen a secuencias de este promotor, pero que son muy diferentes bioquímicamente a NAT2, presentando las características del grupo de proteínas HMGI (high-mobility group I). NAT1, también factor de nódulo, se une en otras regiones, mientras que LAT1, un factor de hoja, se une a las mismas secuencias que NAT2.

Por otro lado, al analizar el promotor del gene de la glutamino sintetasa *gln-γ* de frijol, se encontró otro factor nuclear (PNF-1) que se une al DNA en secuencias también ricas en A/T, como el de NAT2 (Forde et al., 1990) (Figura 12). La comparación entre los diferentes sitios de unión a proteína de los promotores de soja y frijol, reveló un motivo consenso de 8pb (TATTTWAT), que se encuentra en algunos casos dentro de un palíndromo imperfecto de longitud variable (Figura 13b). En ensayos de retardamiento en geles, utilizando oligos mutados en algunas de las bases de esta secuencia consenso, se encontró que este motivo es clave en el reconocimiento de los factores nucleares de frijol (Forde et al., 1990). De la misma

manera, al mutar el sitio de unión de NAT2 en los promotores de *lbc3* y N-23 de soya, se disminuyó la afinidad DNA-proteína (Jacobsen et al., 1990). Sin embargo, aparentemente hay secuencias externas a este motivo que también están involucradas en el reconocimiento DNA-proteína, ya que hay mutaciones fuera de este sitio que afectan la unión significativamente (Jacobsen et al., 1990).

La relación de estas uniones DNA-proteína con la expresión genética no es muy clara. Originalmente se pensaba que todos los factores protéicos que unían DNA estaban directamente involucrados en el control de la expresión. Pero al deletar toda la zona donde se encuentran estas secuencias de unión en el promotor de *lbc3*, la expresión no disminuye mayormente (Stougaard et al., 1990). Se ha especulado que NAT2 puede ser un componente de la estructura de la cromatina en su estado "relajado", y que podría estar relacionado con el andamiaje nuclear, pero no hay pruebas que lo confirmen (Stougaard et al., 1990; Jacobsen et al., 1990). Por otro lado, no se ha podido demostrar que todos los elementos *cis* que influyen en la regulación genética lo hagan a través de su unión con proteínas. En el caso del promotor de *lbc3*, por ejemplo, se da el caso de elementos de la región de control que influyen en la regulación nódulo-específica (OSE) y que no unen proteína en ensayos *in vitro* (Jensen et al., 1988; Forde et al., 1990). Sin embargo, la función del OSE sí depende de la secuencia, ya que al introducir mutaciones en las secuencias consenso dentro de este elemento, la órgano-especificidad se pierde (Jorgensen et al., 1991).

## OBJETIVO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Durante la nodulación se presenta un fenómeno muy interesante desde el punto de vista de la regulación genética. En ella se dan al mismo tiempo dos procesos diferentes, pero que interaccionan entre sí: el de la organogénesis y diferenciación de un nuevo órgano, y el del establecimiento de la simbiosis entre dos organismos. Cada uno de estos procesos, si se desarrollara independientemente, requeriría de un programa genético regulado de manera muy fina. Pero además, el hecho de que se combinen en el mismo fenómeno, hace que esta regulación sea aún más delicada y compleja.

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio sobre los promotores de los genes de la planta específicos de la nodulación, con la finalidad de aproximarnos a la comprensión de la regulación genética de la misma. Para este fin, se ocupará como modelo la región de control del gene de N-30. A pesar de que se desconoce la función de esta proteína *in vivo*, es de suponerse que juega un papel importante en el funcionamiento del nódulo, dada la abundancia de su transcrito. Otros aspectos de la caracterización molecular y bioquímica de esta proteína y su gene se están desarrollando paralelamente en este laboratorio.

Nos interesa determinar si la región de control del gene de la Nodulina 30 contiene secuencias regulatorias semejantes a las de los otros promotores de nodulinas tardías ya analizados; además, averiguar si es capaz de dirigir la expresión nódulo-específica y temporal del gene.

Para llevar a cabo este objetivo, proponemos la siguiente estrategia experimental:

- i) Realizar la secuencia de la región de control del gene de N-30, y hacer un análisis comparativo con otros promotores de nodulinas tardías ya estudiados.
- ii) Construir un gene quimérico, fusionando la región regulatoria del gene de N-30 a la región codificadora del gene de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), y analizar la expresión del mismo en nódulos de plantas transgénicas de *Lotus corniculatus*.

Ya que el sistema de transformación de *Lotus corniculatus* no se encuentra establecido en el Instituto de Biotecnología, se deberá también montar la metodología de transformación, con objeto de poder analizar las construcciones obtenidas.

## MATERIALES Y METODOS

### I ) Material biológico:

Las cepas de *A. rhizogenes* AR12 (His<sup>-</sup>, Rif<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>; /pRi15834::5'35S-GUS-3'NOS), AR14 (His<sup>-</sup>, Rif<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>; /pRi15834::5'35S-CAT-3'NOS), y C58C1/pRi15834 (silvestre, usada como receptora), fueron obtenidas de J. Stougaard (Dep. Mol. Biol. and Plant Physiol., Univ. of Aarhus, Denmark).

Se utilizó la cepa de *E. coli* CMK (F+) proveniente de Stanford University, para transformaciones, siguiendo un procedimiento estándar con polietilenglicol y DMSO (Chung et al., 1989).

Los derivados de pBIN19 (Jefferson et al., 1987), conteniendo las fusiones del promotor de N-30 con GUS y el p35S-GUS (5' 35S-GUS-3' 35S) (Stockhaus et al., 1989), fueron movlizados de *E. coli* CMK al *A. rhizogenes* C58C1/pRi15834 por medio de una conjugación triparental (Ditta et al., 1980), usando como ayudante *E. coli* CMK conteniendo el plásmido pRK2013 (Petit et al., 1987). Las transconjugantes fueron seleccionadas en LB con rifampicina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). La integridad de los genes quiméricos fué verificada por medio de restricción de DNA plasmídico antes de transformar las plantas.

### II) Transformación y regeneración de *Lotus corniculatus*:

Para la generación de plantas transgénicas, se utilizaron semillas de *L. corniculatus* variedad "Rodéo", provistas por la Cooperative Agricole Mathieu, Francia. Se colectaron en nitrógeno líquido hojas, raíces y nódulos de las plantas transformadas, a las 5 semanas de la inoculación con *R. loti*; se guardaron a -70 C hasta su utilización.

Las plantas transgénicas se generaron siguiendo el protocolo de Petit et al., (1987), que consiste, brevemente, de los siguientes pasos:

- 1.- Se esterilizan las semillas con una solución al 2% de NaClO, durante 15 min. Se enjuagan con agua estéril.
- 2.- Se germinan las semillas en cajas de Petri con medio 1/2 B5 y agar al 1.2%.
- 3.- Se hieren plántulas de 5 días en el hipocotilo, con una aguja embebida de *A. rhizogenes*. Las bacterias se toman directamente de colonias frescas crecidas previamente en LA (Luria-agar) a 30 C durante 2 días.
- 4.- Después de dos semanas de cultivo en luz continua, se cortan los segmentos de tallos que hayan desarrollado raíces "velludas" ("hairy roots") y se cultivan en cajas con 1/2 B5+carbenicilina (500µg/ml), con objeto de inhibir el crecimiento del *Agrobacterium*.
- 5.- Se cultivan los explantes 8-10 días sin luz y se cortan los tallos. Se dejan otros 20-30 días en la oscuridad.
- 6.- Las raíces bien desarrolladas se subcultivan en 1/2 B5 y se transfieren a

la luz. En un lapso de una semana a un mes se generan brotes de *L. corniculatus* por organogénesis espontánea.

7.- Brotes de 3 a 5 cm son cortados y transferidos a medio nuevo para enraizar.

8.- Las plantas enraizadas (una a tres semanas), se transfieren a macetas con una mezcla de vermiculita y "leca", y se cubren con bolsas.

9 - Se inoculan las plantas con 2ml de un cultivo en fase exponencial de *Rhizobium loti* NZP2037 (Petit et al. 1987) crecido en YMB sin manitol, dos días después de la transferencia, y se riegan con una solución nutritiva de sales (B&D) (Broughton y Dilworth, 1971).

Ya que uno de los objetivos de este trabajo era montar el sistema de transformación de *L. corniculatus*, las principales modificaciones a este método se describen en resultados.

### III) Ensayo fluorimétrico:

La reacción fluorogénica de la  $\beta$ -glucuronidasa con extractos crudos de nódulo, raíz y hoja, fué llevada a cabo de acuerdo a Jefferson (1987a). La concentración de proteína por muestra fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). La actividad de GUS fué calculada en (Picomolas de 4-metilumbeliferona/mg de proteína/minuto)

### IV) Localización Histoquímica:

Los cortes de los nódulos se hicieron manualmente, cortando una rebanada delgada con dos navajas de rasurar sostenidas por un mango de bisturí. El ensayo para detectar GUS se realizó según el método de Jefferson (1987a,b).

### V) Manipulaciones de DNA:

Técnicas estándar de manipulación fueron usadas, de acuerdo a Maniatis et al.(1982). Las enzimas de restricción fueron compradas de: Boehringer Mannheim, BRL, Amersham y New England Biolabs, y usadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### VI) Secuencia de DNA:

La secuencia de la clona pGN338 fué realizada por el método de Sanger et al.(1977), utilizando un estuche de Sequenase de United States Biochemical, utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos usados para secuenciar fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología (UNAM) por el método de fosfito-triéster.

Para analizar la secuencia se usaron los programas Seqaid y PC Gene. Los alineamientos de secuencias de aminoácidos se hicieron de acuerdo al método de Needleman y Wunsch, modificado por Gotoh (1982), con 50 corridas al azar. La detección del péptido señal se hizo de acuerdo a von Heijne (1986).

### **VII) Vectores:**

Para construir las fusiones transcripcionales del promotor de N30 y GUS, se utilizó el plásmido pGUS (Köster-Topfer et al., 1989), que contiene la región codificadora del gene de la  $\beta$ -glucuronidasa y el terminador 3' del gene de la nopalina sintasa, en pUC 18.

Estas construcciones fueron introducidas a *A. rhizogenes* subclonándolas previamente en el plásmido pBIN19 (Jefferson et al., 1987).

### **VIII) Banco de DNA genómico:**

El banco genómico de frijol *Phaseolus vulgaris* L. cv Saxa, fué construido en Clonetech, digiriendo parcialmente el DNA genómico con Sau3A y clonándolo en  $\lambda$ EMBL3.

### **IX) Análisis de DNA por hibridación tipo Southern:**

El DNA fué digerido con las enzimas de restricción adecuadas, separado por electroforesis en un gel de agarosa, y transferido alcalinamente a una membrana (Hybond-N+). Las sondas fueron marcadas con  $^{32}\text{P}$ , por medio de "random priming", utilizando un estuche de marcaje de New England Nuclear (Dupont). Posteriormente las membranas fueron prehibridadas por una hora y expuestas a las sondas correspondientes, ya marcadas, durante 8hrs. Las condiciones de hibridación fueron: 42°C, 50% formamida. Se hicieron dos lavados (30min), a 65°C (1XSSC; 0.5 SDS).

## RESULTADOS

### I) Obtención de la clona genómica de N-30:

Al iniciar este trabajo se contaba con varias clonas de cDNA de la N-30 (Campos et al., en preparación). Con objeto de tener una clona que contuviera la región de control del gene de N-30, se buscaron clonas en un banco genómico de *Phaseolus vulgaris* cv Saxa, usando como sonda la clona de cDNA pN311. Se aislaron cuatro clonas (123, 132, 192, 193) Sin embargo tres de ellas (123, 132, 193) resultaron ser iguales. Se continuó trabajando con la clona 123 ( $\lambda$ -GN123) (Figura 2), ya que la clona 192 fué descartada por tener un fragmento correspondiente a la región de control muy pequeño.

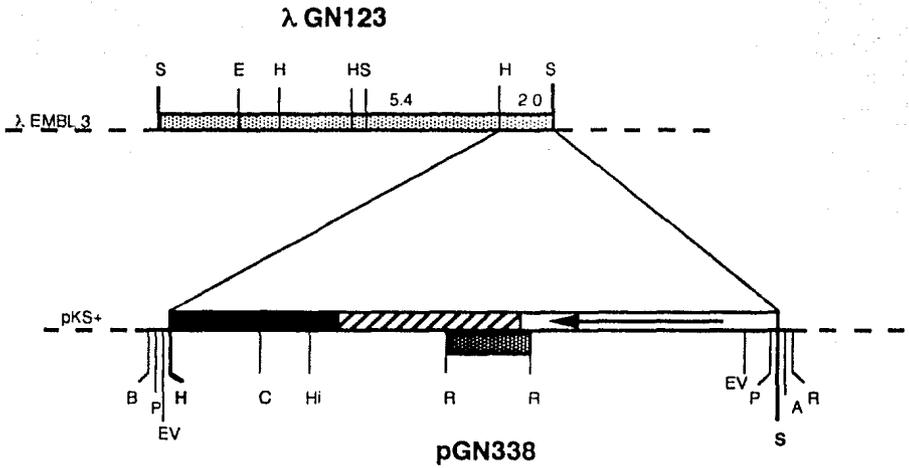
Para detectar en qué región de la clona genómica se localizaba el gene de N-30, se hizo un Southern de la clona 123, utilizando como sonda la clona completa de cDNA (Figura 3) y un fragmento de 220pb del extremo 5' de la misma (pN351). Se subclonó el fragmento de 2.1 Kb de la digestión Sal I-Hind III, que hibridó fuertemente con la sonda del 5' del cDNA, en el vector Bluescript (pSK+), generándose la clona pGN338 (Figura 2). Subclonando el mismo fragmento en Bluescript (pSK+), se construyó la clona pGN383, que fué usada para secuenciar. Se subclonó también el fragmento Sal I-Sal I de 7Kb que hibridó contra la sonda completa de cDNA, generándose la clona pGN339 (Figura 4).

Se mapeó por restricción a su vez la clona pGN338 (Figura 2 y Figura 5), y además, con objeto de determinar la orientación del gene de N-30, se hibridó contra el extremo 5' (200pb) de la clona de cDNA pN311 (Figura 5). A partir de esta hibridación, se deduce que dentro del inserto Sal I-Hind III, el 5' del gene corresponde al extremo de Sal I, es decir, al extremo de la clona genómica en  $\lambda$  (Figura 2).

### II) Secuencia de la clona genómica de N-30:

Aunque este trabajo está centrado en la región de control del gene de N-30, se secuenció la totalidad de la clona pGN338, ya que estamos interesados en caracterizar molecularmente el gene de la N-30 en sus diversos aspectos. La secuencia obtenida comprende: la región regulatoria del gene, la mayor parte de la región codificadora y parte de un intrón (Figura 6 y Figura 7).

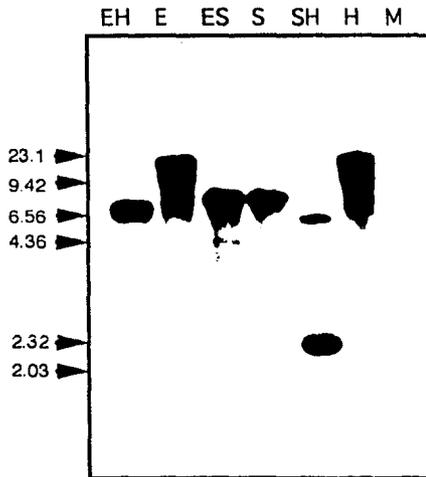
II.1) Región codificadora: Al hacer el alineamiento de las secuencias de la clona genómica y la clona de cDNA se encontró que hay un intrón, faltando unas 48 bases para que termine la secuencia codificadora (lo correspondiente a 16



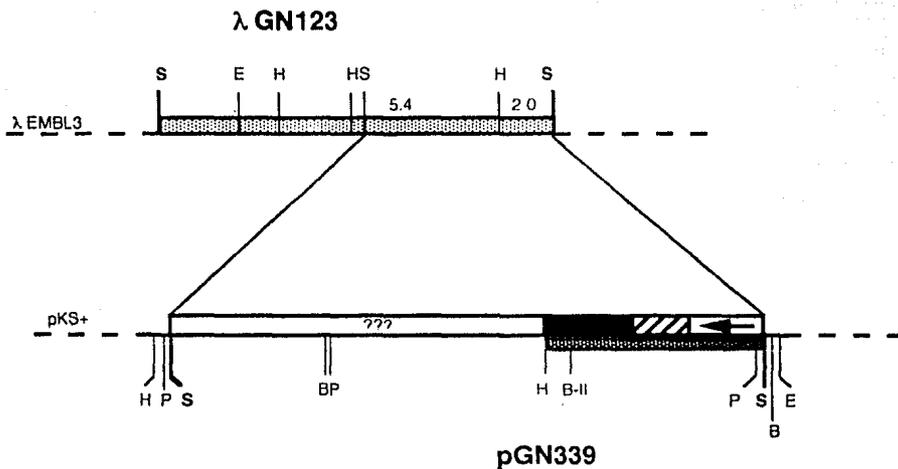
**Figura 2: Mapa de la clona genómica λGN123 y construcción de pGN338**

- Promotor de N30
- Región codificadora
- Intrón
- Fragmento que hibridó con la sonda 5' del cDNA
- Fragmento de DNA genómico en λ

A= Apa I; B=Bam HI; B-II=Bgl II; C= Cla I; E=Eco RI; EV=Eco RV; Hi=Hinc II; H=Hind III; p=Pst I; R=Rsa I; S=Sal I



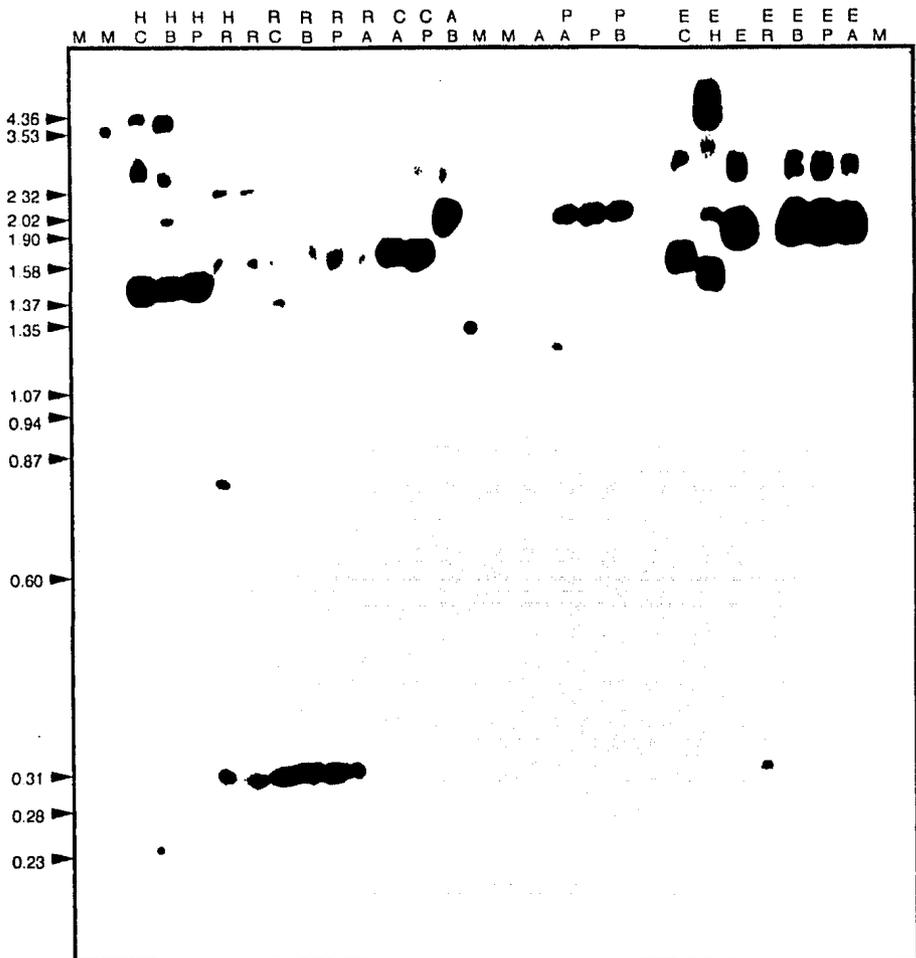
**Figura 3:** Southern de la clona genómica en  $\lambda$ GN123, hibridando con la sonda de cDNA pN311 (920pb). A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular en Kb  
 E=Eco RI; H=Hind III; S=Sal I; M=Marcadores de peso molecular



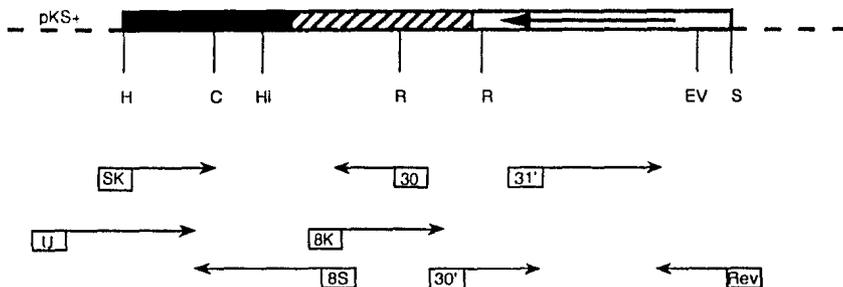
**Figura 4: Construcción de la clona pGN339**

- |                                                                                     |                                |                                                                                   |                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|    | Promotor de N-30               |  | Región codificadora                            |
|    | Intrón                         |  | Fragmento que hibridó con la sonda 5' del cDNA |
|  | Fragmento de DNA genómico en λ |                                                                                   |                                                |

B=Bam HI; B-II=Bgl II; E=Eco RI; H=Hind III; p=Pst I; S=Sal I



**Figura 5:** Southern de la clona genómica pGN338, hibridando como sonda con el extremo 5' (200pb) de la clona de cDNA pN311. A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular en Kb.  
 A=Apa I; B=Bam I; C=Cla I; E=Eco RV; H=Hinc II; P=Pst I; R=Rsa I; M=Marcadores de peso molecular

**(A)****pGN338****(B)**

OLIGO	5'	SECUENCIA	3'
N30		GCAACTAATCCTGCAAAGATC	
N30'		GATCTTTTGCAGGATTAGTTGC	
8K		GTCCTAAAGTTGATGC	
8S		TGACTCTGCTCGTTCCA	
31'		CACAACCTGACTCATTTGT	
U		GTTTTCCCAGTCACGAC	
Rev		AACAGCTATGACCATG	

**Figura 6:** (A) Estrategia de secuenciación de la clona genómica pGN338. Los rectángulos señalan la localización de los oligonucleótidos utilizados y las flechas indican la extensión de la secuencia hecha con cada uno.

C= Cla I; EV=Eco RV; HI=Hinc II; H=Hind III; R=Rsa I; S=Sal I



Promotor de N30



Región codificadora



Intrón

(B) Oligonucleótidos usados para secuenciar la clona pGN338.

aminoácidos, de acuerdo a la clona de cDNA) (Figura 7 y Figura 8). En el resto de la secuencia son casi idénticas (96%), divergiendo principalmente en la proximidad del intrón. Se encuentran en la secuencia de la clona de cDNA 6 bases extra en la posición +405 (respecto al ATG), seis en (+615) y tres en (+622) (Figura 8).

Al comparar la secuencia, tanto del cDNA pN-311 (Campos et al., en preparación) como de la clona genómica de N-30 pGN338, con otras secuencias en un banco de datos, se encontró que N-30 se asemeja a la familia de nodulinas tardías de soya descrita por Sandal et al., (1987), Sengupta-Gopalan et al. (1986) y Jacobs et al., (1987). Este grupo consiste de por lo menos cinco proteínas (N20, N22, N23 y N44), que presentan como características principales: a) Una secuencia que aparentemente codifica para un péptido líder, b) Dos dominios muy conservados entre ellas (70-90%) en los que se encuentran cuatro residuos de cisteínas en una distribución que asemeja "dedos de zinc"; c) Una región rica en prolínas en el extremo carboxilo terminal (Sandal et al., 1987). Sin embargo, tampoco se conoce con precisión el papel que desempeñan estas proteínas en soya, habiéndose localizado aparentemente en diferentes compartimientos celulares (Jacobs et al., 1987).

En conjunto, encontramos una identidad del 37.8% y una similitud del 8.7% entre la secuencia de aminoácidos predicha para N-30 por la clona genómica y la familia de nodulinas de soya; siendo la calificación de alineamiento de 17.4 en promedio, sobre una de 3.0 que se considera significativa. Dentro de esta familia, las proteínas más parecidas a la N-30 son la N-20 (48.8% identidad, 8.6% similitud); la N-22 (43.7% id., 8.9% sim.); y la N-27 (41.3% id., 6.1% sim.). En especial, se identificaron dos dominios con una homología aún más alta entre N-30 y las tres nodulinas de soya más cercanas (N-20, N-22 y N-27): el dominio correspondiente a las cisteínas conservadas (65% id., 9% sim.) (Figura 11a) y el del péptido líder (58% id., 11% sim.) (Figura 11b). En el extremo carboxilo de la N-20 encontramos un tramo de prolínas semejante al encontrado en N-30, aunque no tan largo (8 prolínas en N-20, en relación a 18 prolínas en la secuencia de N-30 predicha por el cDNA). Otra característica de N-30 común con los genes de soya, es que en éstos también se encuentra un intrón, en una posición semejante a la del intrón de N-30.

II.2) Región de control: dentro de esta región se marcan la caja TATA y los posibles sitios de inicio de la transcripción y de la traducción (Figura 7). Para señalar el sitio de inicio de la transcripción más probable, se tomaron en cuenta las predicciones hechas por Joshi (1987), de acuerdo al consenso de 79 promotores de genes vegetales. Además se comparó la secuencia de la N-30 con la de la región correspondiente de las nodulinas N23 y N20, cuyo sitio de inicio de la transcripción fué determinado por "primer extension" (Sandal et al., 1987). En esta zona en particular se encuentra una alta homología entre la secuencia de N-30 con la de la región correspondiente de N-20.

. . . . .

GATCAAAAATTAATTAGTTCCTATATTGACTAAATTAGAGACTACCATTTTATAATTAAAAAACTATTGGAT -791  
Sau3A A/T 6

ATCTAAAAGTAGTTTCTATATATAAAGATTATAAAATAATTTTAAATTTGGTATCTAATTACTATTATTAA -721  
AAA 2 A/T 5

GTGTTTTCGTTACTAATTACGATATCTAAATTAATTTTTCATTTTAACTAATTTTGAAGACTAA -651

ATATTAATAACTAAAATTTAGTAACTAATTTAAATTTCAATTTAAAAACTATTTTATATATTTTATAT -581  
A/T 4 →A/T 3→→

ATAGAAATCACATTCAACTACTAATAATTTTAACTCTTAAATTAGTATTTAATTTAATAAATGACTAAT -511

TTTTTTATCTTTAAATTACTAATTTTCTTGTATTGTATATATATATATATATATATATATATATATATC -441

GTTATAATTAATATTTTAAAAACTAAAAAAATAAATACAAATATTACATATTTTGTATATTAATATA -371

CTTTAAACTTTTATAAAAACAATTTTCAAGATAAAAATTTACTTAAATACTATAAAATATTTTATTTTTA -301

TTTAATATAAAATCTAACATAAATATGAAATGTTTTATCGTATAGATTTTTATCATAGTATATAAAAT -231  
A/T 2 . . . . .

ACATTAATTTTATTATTTGTTAGAGAAGGTATATATATTTTTAACTCTTGAAAAACAAAATGAGTCAGG -161  
A/T 1 CT

TTGTGCTAATAAAGATGAAAGGTCGTTATAAATTTGTATAATAAACATGTTTCATGGTTCTACATCTCTCT -91  
AAA 1

↓ ↓

ATATATACTGTAAAATTCATGTACCTCAGCACCAAAACAAAATCTAAAACGTAAATTTGGTTTATCACTGG -21  
TATA RsaI +1 cDNA →

AAATCCAATTGAGGGAGAAAAATGAGAGCCATACTAAATTACTCTGTTCTGATCCTAAGTGGTAGTTGC +50  
MetArgAlaIleLeuIleThrLeuPheLeuIleLeuSerValValValAla

AGAAGAGGCAGAAAGATGCTGCAATTTGTGAAACCATTGATCCTGCAAAAGAAGCAGGAATTTCTGTAGCA +120  
GluGluAlaGluAspAlaAlaIleValGluThrIleAspProAlaLysGluAlaGlyIleSerValAla

ACTAATCCTGCAAAAGATCATGGAATTTGGTGGAACTGGTGAATCAATGACTTTGCTGAAGATGCTGGAG +190  
ThrAsnProAlaLysAspHisGlyIleGlyGlyThrGlyGluIleAsnAspLeuAlaGluAspAlaGlyVal

TTGGTATTAGCAAAGCCATTTATCAAACTTAGTGGGCAACCTGAAGCGTACGAATCTCCAAGATTCAA +260  
GlyIleSerLysAlaIleTyrGlnThrLeuSerGlyGlnProGluAlaTyrGluSerProArgPheLys

GAGGTTTGTGACACATTCGAGCTCACATGTTGCTGAAACATGCAGTGATCCAATGCACATATGAGGGTGGAA +330  
ArgPheValThrHisCysSerSerHisValAlaGluThrCysSerAspProMetHisTyrGluGlyGly  
Zn 1

ATCCGTAACCAACTGGGTTGTCTCACTGCATTTTTGATTCATGAAAGCATGCTTGGCAAATCATAAAG +400  
IleArgAsnProThrGlyLeuSerHisCysIlePheAspSerMetLysAlaCysLeuAlaAsnHisLysAla  
Zn 2

CCTCGCTTATGACTCCGCTCGTTCCAAAACCTAAATCTTAAACCCACAAAAGTCGAATATTTACCGGT +470  
 SerLeuTyrAspSerAlaArgSerLysThrLeuAsnLeuLysProThrLysValGluTyrLeuProVal

TATCATTGACAGTAAAATTTCAAACGTGTGGAAAACCTGCTCTCAGTCAGTGCACAAAAGTTGTTTG +540  
 IleIleGlnThrValLysPheGlnThrValTrpLysThr CysSerGlnValSerAlaGlnSerCysLeu  
 Zn 3

AGTGATTCTGATGTTGATGCATCAACTTTAGGAGCTTGTCTCTTACCATCTTTTAACCAGTGTGTGATC +610  
 SerAspSerAspValAspAlaSerThrLeuGlyAla CysLeuLeuProSerPheAsnGlnCysValTyrPro  
 Zn 4

CTACTCCACCTCCACCACCTCCACCACCTCCTCCTGGTAAGACTTCTTTAATAATATATATGATTTAAGA +680  
 ThrProProProProProProProProProPro

AATATAATTAACACACTTTTATTCTGTATTTTGTAAACAAAACCTCATTTTATAGATTAACCTCTACAAAAT +750

TCTACCTTTTACCACACTACTTTTTCATTAAAACAAAAAAATAAATAATAAAAAATAATATTTAGTTTA +820

GAGTTTATGTTTAGAATTAAGAITAAGGTTTACACATACAAACTCTAAATTCITAGATCTTATATCGAT +990

TTAAAAATAAAAAATATTTTCATAATATATAAAATTTTATGTTTTATTTTATTATAAAATTACATAAATGCAT +1060

CATTTCATGTGAAATTTTTGAAAAACATGTAANTANTTCGAAAACCATTACATGAGCAGATATATTTTCAT +1130

AATGGAATAGAAGTAGTTTCATCAAAACAAATTAATATTATAGGATTTTCAAAAACATAACACTAATGTG +1200

GCTTCTTATAGTTTTTTCTTACATATATGTGTTCTTATTATATCTGATGAATCACATGTTTTCCATTGCTT +1270

CTTCTTTTTTCTGGAATTAATGTTTATATTTTAGAAGCTT +1310  
 HindIII

**Figura 7 Secuencia nucleotídica de la clona genómica de N-30 (pGN338).**

Se indican los sitios de restricción relevantes (Sau3a, RsaI, HindIII). La posible caja TATA, el codón del posible inicio de la traducción (ATG) y el posible inicio del intrón (GT) están subrayados. Se señalan también las secuencias con homología al consenso de elementos órgano-específicos de nódulinas tardías (AAA=AAAGAT y CT=CTCTT) (Stougaard et al., 1987; Sandal et al., 1987) y al consenso rico en A/T de sitios de unión de factores protéicos de nódulo (A/T=TATTTWAT) (Forde et al., 1990). Los palindromos imperfectos relacionados con ellos se marcan (. ^ ) y los repetidos directos de 13pb se indican (→→). Los posibles sitios de inicio de la transcripción se indican con flechas verticales (↑), predichos por comparación con la región de homología de N-20 de soya (Sandal et al., 1987). La secuencia de aminoácidos codificada por la región estructural del gene se muestra debajo de la secuencia de DNA. Los posibles "dedos de zinc" se muestran subrayados (Zn). (El sitio de Sau3A fué utilizado para hacer el banco genómico y se encuentra a 19pb del sitio de Sal I mostrado en el mapa de la clona genómica en λ).



```

NOD311 - AEDAAIVETIDPAKEAGISVTTNPAKDHGIG -31
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::
P38 - MRAILITLFLILSVVVAEEAEDAAIVETIDPAKEAGISVATNPAKDHGIG -50

NOD311 - GTGEINDLAKDAGVGISKAIYQTLSGQPEAYESPRFKRFVTHCSSHVAET -81
          :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::
P38 - GTGEINDLAEDAGVGISKAIYQTLSGQPEAYESPRFKRFVTHCSSHVAET -100

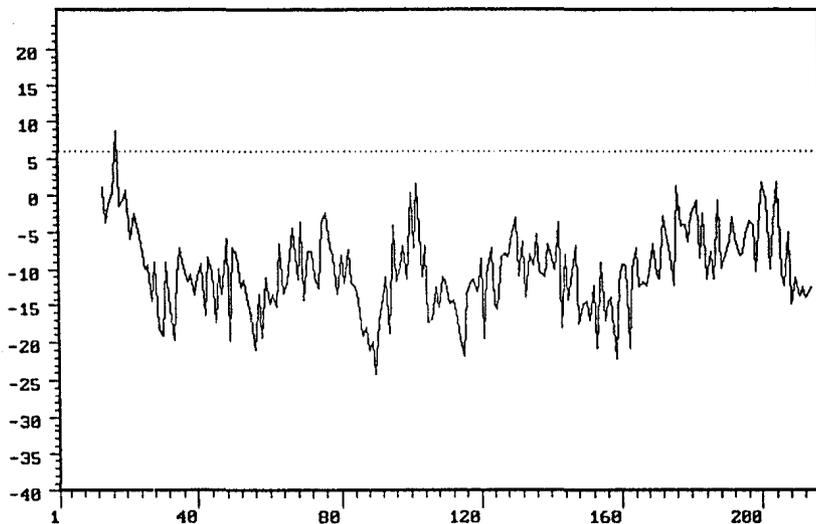
NOD311 - CSDPMHYEGGIRNPTGLSHCIFDSMEACLANHKASFsfyDSARSKILNLK -131
          :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::
P38 - CSDPMHYEGGIRNPTGLSHCIFDSMKACLANHKASL--YDSARSKTLNLK -148

NOD311 - PTKVEYLPVIIQTVKFQTVLKTCSQVSAQSCLSDSVDASTLGACLLPSL -181
          :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::
P38 - PTKVEYLPVIIQTVKFQTVWKTCQVSAQSCLSDSVDASTLGACLLPSF -198

NOD311 - NQCvyHTQMPPiPPPPPPPLRPPpQRPPPPTPPADKTRR -220
          ::::: : : : :::::
P38 - NQCvyPTPPPPPPPPPP -215

```

**Figura 9: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos predichas para N-30 de la clona genómica pGN338 y de la clona de cDNA pN311.**  
 NOD311 corresponde a la clona de cDNA, y P38 a la clona genómica.  
 La identidad entre dos aminoácidos se denota como (:) y la similitud como (.)



**Figura 10: Curva de detección de péptido señal eucariote.**

Hecha de acuerdo a Von Heijne (1986), sobre la secuencia de aminoácidos predicha para N-30 a partir de pGN338. La línea punteada indica el valor mínimo significativo para un péptido líder eucariote (6). El valor obtenido por la la secuencia de aminoácidos predicha para N-30 es de 8.82, encontrándose un sitio potencial de corte entre los residuos 17 y 18. Para analizar la secuencia se usó el programa PC Gene.

Ya se han analizado varios promotores de nodulinas tardías, habiéndose encontrado algunas secuencias consenso entre ellos que están involucradas en la regulación de la expresión. Al buscarse en la región de control de N-30 secuencias homólogas a las previamente determinadas, se localizaron en la región proximal del promotor (alrededor de -140) los dos motivos consenso del elemento del promotor de *ibc3* de soya que confiere expresión órgano-específica (CTCTT y AAAGAT) (Figura 7 y Figura 12). La secuencia AAAGAT es parte de una secuencia más larga (15pb), encontrada en posición similar en los promotores de *Srglb3* de *S. rostrata*, N-23 de soya y *gln-γ* de frijol (Figura 13a) (Sandal et al., 1987; Stougaard et al., 1987b, 1990; Metz et al., 1988; Forde et al., 1990). También se encontró una copia del motivo AAAGAT más arriba (-758), de manera semejante a lo que sucede en el promotor de *gln-γ* de frijol (Figura 7 y Figura 12) (Forde et al., 1990).

En cuanto a las secuencias relacionadas a la unión de factores nucleares, se encontraron en 5 lugares diferentes secuencias que cazan con el motivo de 8pb TATTWAT (señaladas como secuencias A/T en la Figura 7) (Figura 7 y Figura 12). Esta secuencia parece estar conservada entre los sitios de unión a proteínas de diferentes promotores (Figura 13b) (de Bruijn et al., 1988; Jensen et al., 1988; Metz et al., 1988; Jacobsen et al., 1990; de Bruijn et al., 1990; Forde et al., 1990; Jorgensen et al., 1991). Dos de ellas (A/T1 y A/T6 en la Figura 7), se encuentran dentro de un palíndromo imperfecto, como lo están varios de los sitios que unen factores nucleares (Figura 13b), y las secuencias A/T4 y A/T3 están formando parte de dos repetidos directos de 13pb.

Las secuencias correspondientes a los repetidos invertidos InvA e InvB, incluidos en los elementos positivos PE-A y PE-B del promotor de N-23 (Figura 12) (Jorgensen et al., 1991), no fueron encontradas.

### III) Construcción de genes quiméricos con el promotor de N-30:

Una vez que contamos con la secuencia de los alrededores del sitio de inicio de la traducción, se pudo delimitar un fragmento correspondiente al promotor de N-30 de alrededor de 860pb hasta el ATG y localizar la caja TATA. Utilizando un sitio de *Rsa* I localizado 14pb hacia abajo de la caja TATA y un sitio del "polilinker", se obtuvo un fragmento *Rsa* I-*Rsa* I que contiene el promotor casi completo. Este fragmento fué usado para hacer una fusión transcripcional, clonándolo frente a la secuencia codificadora de la enzima β-glucuronidasa (GUS), en el sitio de *Sma* I del plásmido pGUS (GUS-3'NOS en pUC18) (Köster-Töpfer et al., 1989), originando la clona pGN30-G1. La construcción completa fué clonada entonces como un fragmento *Eco* RI- *Hind* III en el plásmido binario pBin-19 (Bevan, 1984), generando la clona pGN30-GB1 (Figura 14), que fué introducida al *A. rhizogenes* (C58C1/Ri

(A)

EAYESPRFKRFVTHCSSHVAETCSDPMHYEGGIRNPTGLSHCIFDSMKACLANKASL	N-30	
SAYESARFKKFVTHCSSHVAQTCSGNDPLHASG	GLSFCLFDSMEKCLGDHAKLI	N-27
EAYESPRFQKFVTHCSSHVTQTCSGNDPLNNQE	GLSFCLFDSMEKCLADHKASL	N-20
QAYESARFKKFVTHCSSHVAQTCSGNDPLHHQE	GLSFCLFDSMEKCLGDHEAKL	N-22
EAYVSPKLLKFITPCTSHVGETCSTT SSSGSE	GLALCLFDSMERCLVDHGAQL	N-23
EAYESPKLLKLITDCTGHVGETCSTTSSSGSE	GLALCLLDSMERCLLDHQTNV	N-44

IIQTVKFQTVWKTCSQVSAQSCLSDSDVDASTLGACLIPSNQCVP	N-30
LIETVKFRTVLKCTRVSAKFCLSAFNVDTSVLPACLGPNSLNQCVP	N-27
LIETVKFRAVLKCTSHVSARYCFTNPNVATSALADCLHPSLTHCVIP	N-20
LIETVKFRTVLKCTRVSAQFCLTAPNVDTSVLPACLGPNSLNQCVP	N-22
LIETIQRLRTALRTC <sup>H</sup> VTARTCLTAPNVATSDLEACLTPSMNQCIP	N-23
LIQTTQLR <sup>T</sup> TVLGTCS <sup>H</sup> VTARTCLTAPNVATSDLEACLTPSMNQCVP	N-44

(B)

↓

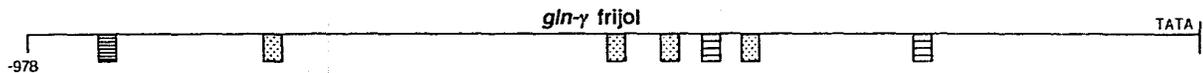
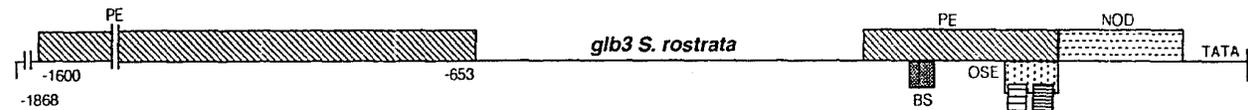
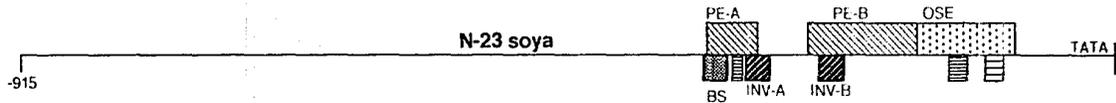
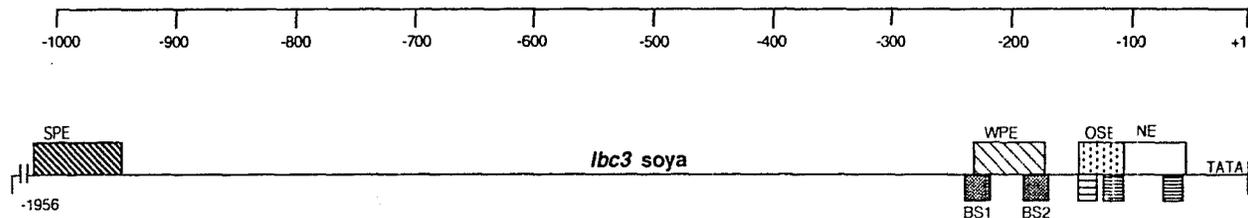
MRAILITLFLILSVVVA	EEAEDA	N-30
(MEK)MRVVLITLLLFIGAAVA	EKAGNG	N-27
MRVVLITLFLFIGAAVA	EDAGII	N-20
(MEK)MRVVLITLLLFIGAAVA	EKAGNG	N-22
(MEK)MRVIVITVFLFIGAAIA	EDVGIG	N-23
MEEKILMRVIVITVFLFIGAATA	EDAAAE	N-44

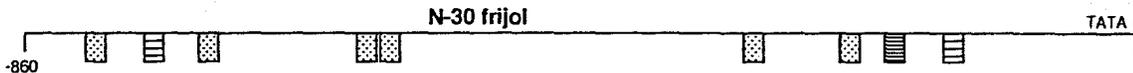
FIGURA 11: (A) Comparación de la región de homología entre N-30 y la familia de nodulinas de soya.

Los aminoácidos conservados en todas las proteínas se resaltan en negritas, y las zonas correspondientes a los posibles dedos de zinc están subrayadas.

(B) Comparación de la región del posible péptido líder entre N-30 y la familia de nodulinas de soya.

Los aminoácidos conservados en todas las proteínas se resaltan en negritas, y se señala con una flecha el posible sitio de corte del péptido líder.





**Figura 12: Organización de los elementos de control en los promotores de los genes de diferentes nodulinas tardías.**

Elemento positivo fuerte (SPE)

Elemento positivo (PE)

Elemento positivo débil (WPE)

Elemento órgano-específico (OSE)

Elemento negativo (NE)

Elemento específico de nódulo (NOD)

Elementos determinados por delecciones del promotor fusionadas a un gene reportero.

Secuencia AAAGAT

Secuencias consenso del elemento OSE

Secuencia CTCTT

Sitios de unión a proteína (determinados experimentalmente)

Secuencias ricas en A/T homólogas al consenso de sitios de unión a proteínas TATTWAT

Invertidos repetidos

## (A)

GENE	ESPECIE	SECUENCIA
lbc3	Soya	TTGAAAAGATGATTG- 90pb-TATA
gln-gama(1)	Frijol	TTTTTAAGATGTTTG-128pb-TATA
gln-gama(2)	Frijol	TACCAAAGATGAAAA-302pb-TATA
N-23	Soya	TTATAAAGATGAAAG- 53pb-TATA
N-30(1)	Frijol	<u>TAATAAAGATGAAAG</u> - 54pb-TATA
N-30(2)	Frijol	<u>ATATAAAGATTATAA</u> -667pb-TATA
CONSENSO		TTNWAAGATGAWWG

## (B)

GENE	ESPECIE	SECUENCIA
lbc3(1)	Soya	..... ^ ..... GATATATTAATATTTTATTTTATA
lbc3(2)	Soya	..... ^ ..... ATAATACTTAAATTTATTTATT* ..... ^ .....
N23(1)	Soya	..... ^ ..... ATATAAAAATTGATATTTTATATAATATATTA* ..... ^ .....
N23(2)	Soya	..... ^ ..... TAAAATTAAGAGTTGCTTTATTTTATTATTTAAAAATG* ..... ^ .....
Gln-gama(1)	Frijol	..... ^ ..... ATACTAATTATTATATTTAAT* ..... ^ .....
Gln-gama(2)	Frijol	..... ^ ..... ATATTAATTAGAATATTTAATGG* ..... ^ .....
N30(A/T 6)	Frijol	..... ^ ..... TAAATTAGAGACTACCATTTTATA
N30(A/T 1)	Frijol	..... ^ ..... ATTAAATACATTAATTTTATTTTATT
CONSENSO		<u>TATTTWAT</u>

**Figura 13:** (A) Comparación de elementos OSE (Organ Specific Element) entre los promotores de nodulinas tardías. Se subrayan las bases de los sitios de N-30 que se conforman al consenso general, y se indica la distancia en pb respecto a la caja TATA. (B) Comparación de las secuencias ricas en A/T que unen proteínas entre los promotores de nodulinas tardías. Las bases que se conforman al consenso general del motivo de 8pb, se subrayan. El asterisco señala los casos en que la unión a proteína de esta secuencia ha sido demostrada. Las regiones con simetría de diada imperfecta se indican con puntos, marcando el eje de simetría.

15834) por medio de una cruce triparental Siguiendo el mismo procedimiento se generó otra clona, pero con el promotor en orientación invertida (pGN30-GB3) (Figura 14)

#### IV) Transformación de *Lotus corniculatus* :

##### IV.1) Establecimiento del sistema.

El protocolo que se siguió inicialmente es el descrito por Petit et al. (1987). Se hicieron 11 experimentos tomando este protocolo como base, germinando unas 150 semillas por experimento, en promedio. En los primeros 8 experimentos, mientras se montaba el sistema, se utilizaron para transformar *L. corniculatus*, cepas de *A. rhizogenes* conteniendo los plásmidos pAR12 (5' 35S-GUS-3'NOS) y pAR14 (5' 35S-CAT-3'NOS) (Hansen et al., 1989). En los últimos experimentos se transformó ya con cepas de *Agrobacterium* con los genes quiméricos pGN30-GB1 y pGN30-GB3, además del plásmido p35S-GUS (5'35S-GUS-3'35S) (Stockhaus et al., 1989).

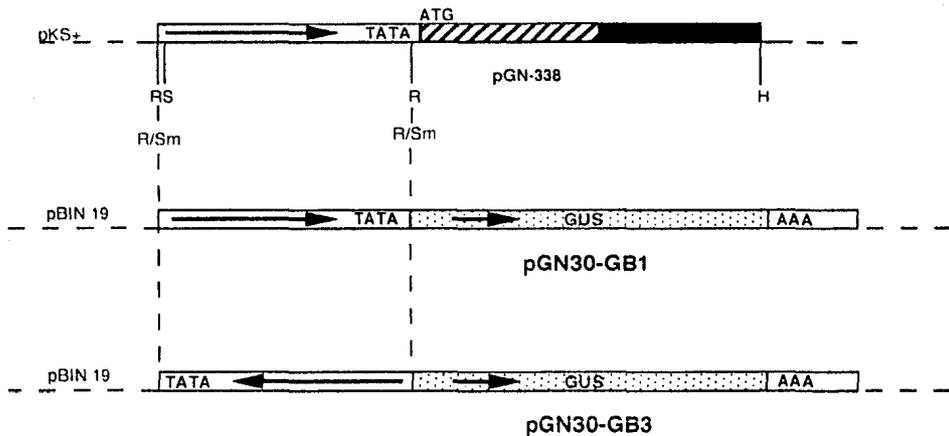
Los principales problemas encontrados, y ajustes realizados al protocolo original (descrito en métodos) fueron los siguientes:

1.- El tipo de soporte (agar-agarosa) para el crecimiento de las semillas, y la concentración del mismo para que enraizaran los brotes apropiadamente. Las raíces de *Lotus* son muy sensibles a sustancias contenidas en el agar. Se probaron varios tipos y concentraciones de agar, e incluso agarosa. El soporte en el que las plántulas y raíces se desarrollaron mejor (el tejido creció, no se oxidó, ni se puso necrótico) fue el Phytagar de Gibco, a una concentración de 1.2% para germinación y 0.56% para cultivo de raíces, generación de brotes y enraizamiento. En este agar los brotes se generaron rápido y crecieron sin problemas, y enraizaron en muy corto tiempo

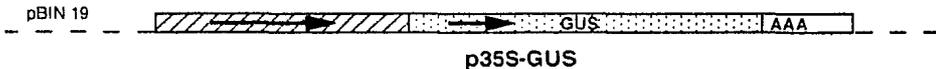
2 - El rendimiento de infección. Aunque el rendimiento de generación de raíces transformadas reportado es de 30% (Hansen et al., 1989), en nuestro caso nunca sobrepasó el 12%, promediando un 8 ó 9%. La eficiencia de infección se trató de mejorar: variando la manera de herir las plántulas (mayor ó menor profundidad de la herida, vertical u horizontal); dejándolas en la oscuridad la noche de la infección (Hansen et al., 1989); y cultivando las plantas después de haber sido inoculadas en luz continua ó en ciclos de luz-oscuridad 16/8 hrs. Ninguno de estos cambios pareció afectar la eficiencia de infección.

3 - La eficiencia de nodulación. La mejor nodulación de las plantas se obtuvo en bolsitas de nodulación con medio B&D, dejando las plantas en las mismas de 3 a 5 días previos a la inoculación, e inoculando con 1-2ml de cultivo saturado (2 días) de *Rhizobium loti* NZP2037 (Petit et al., 1987) crecido en medio PY. Se probó también la nodulación en macetas con vermiculita, pero la formación de nódulos no aumentó apreciablemente. Las plantas se transfirieron a las bolsas de nodulación

(A)



(B)



**Figura 14: (A)** Construcción de genes quiméricos con el promotor de N-30.

**(B)** Plásmido p35S-GUS (Stockhaus et al., 1989)



H=Hind III; R=Rsa I; S=Sal I; Sm=Sma I

con raíces de diferentes tamaños y grados de desarrollo, nodulando mejor las plantas que no tenían la raíz demasiado larga ni ramificada en el momento de la inoculación. Otro factor que influyó en la eficiencia de la nodulación fué la ventilación, siendo importante, sin embargo, una manipulación cuidadosa para evitar la contaminación de las bolsas de nodulación y el marchitamiento de la parte aérea de la planta. Esto se logró transfiriendo las plantas a las bolsas de nodulación en esterilidad, y acomodando éstas en cajas de acrílico cerradas, con una toalla de papel mojada para mantener la humedad de la atmósfera. Las cajas se fueron abriendo gradualmente, permitiendo a la planta adaptarse a condiciones normales de humedad.

#### IV.2) Otros sistemas.

Se usaron también otras dos variantes de este método de transformación:

1 - Procedimiento corto: consiste en nodular directamente las raíces generadas en el sitio de infección con el *A. rhizogenes*, cortando el sistema radicular original (Hansen et al., 1989). Se utilizó este protocolo en dos experimentos con 40 plantas en cada uno. Sin embargo, aunque estas plantas formaron raíces velludas y fueron inoculadas con *Rhizobium*, no produjeron ningún nódulo. El paso crítico fué la desinfección de las plántulas, ya con raíces transgénicas, para eliminar el *Agrobacterium*. De acuerdo al protocolo original se lavan en matraces con medio 1/2B5 conteniendo Tween 60 al 0.01% y 500µg/ml de Carbenicilina, agitándose a 100rpm por 4 días. Pero este procedimiento dañó mucho a las plántulas, aún agitándolas más lentamente (30-40rpm) y sólo durante un día, por lo que debe encontrarse un sistema alternativo para la desinfección. Estas plantas se inocularon con *Rhizobium*, pero no nodularon.

2 - infección de hipocotilos: de acuerdo a este método se cortan segmentos de hipocotilos de 1-2mm y se sumergen en una solución de *A. rhizogenes*. Las raíces transgénicas se generan de los extremos del explante (Tabaeizadeh, 1989). Se hicieron dos experimentos con este protocolo. En el primero (60 plantas), se obtuvo una eficiencia de infección del 52%, contra el 30% reportado, es decir, muy alta comparándola con la de la planta entera. Sin embargo, las raíces nunca generaron brotes y, además, en el segundo experimento (450 plantas), no se obtuvo ninguna raíz. Estos experimentos no se continuaron.

#### V) Análisis del promotor del gene N-30 en plantas transgénicas:

El método de transformación y nodulación optimizado descrito, fué utilizado para introducir las construcciones pGN30-GB1 (5'N30-GUS-3'NOS) y pGN30-GB3 (5'N-30 invertido-GUS-3'NOS) a *Lotus corniculatus*, con objeto de saber si efectivamente el promotor de N-30 es capaz de dirigir la expresión órgano y tejido-específica del gene. Además, se transformaron plantas con el plásmido 35S-GUS (5'35S-GUS-3'35S) (Stockhaus et al., 1989). Este promotor proviene del

transcrito 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), y dirige una expresión bastante fuerte en casi todos los órganos de una planta, en particular en tejido vascular (Jefferson et al., 1987). Se cosecharon los nódulos, raíces y hojas, 5 semanas después de la inoculación con *Rhizobium*.

V 1) Análisis fluorimétrico: los diferentes tejidos cosechados de los *Lotus* transgénicos fueron analizados para detectar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa. Las actividades se muestran en la Figura 15, dadas en (pmol 4-MU/mg proteína/min). Se puede observar que hay una mayor actividad de GUS en el nódulo que en la raíz de las plantas transformadas con el plásmido pGN30-GB1, aunque ésta no es tan alta como se esperaba, especialmente si se la compara con la actividad de GUS bajo el promotor de 35S. El promotor de N-30 invertido aparentemente no dirige la expresión nódulo-específica de GUS, no siendo significativamente diferente de lo observado en la planta silvestre.

V 2) Análisis histoquímico: en los cortes de nódulos transgénicos transformados con la clona pGN30-GB1 (promotor en sentido correcto), se aprecia la coloración azul de GUS sólo en las células infectadas del nódulo (Figura 16b y 16c). En la mayoría de los nódulos transformados con la clona pGN30-GB3 (promotor en sentido inverso) no se puede observar la expresión de GUS en ningún tipo de célula, confirmando los resultados del análisis fluorimétrico. Sin embargo, en un nódulo se pudo ver una ligera expresión en la periferia del nódulo, en la unión con la raíz, que corresponde a los haces vasculares (Figura 16d).

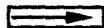
Un resultado interesante fue la expresión de GUS bajo el promotor de 35S. Como se vió en el ensayo fluorimétrico, la expresión fué muy alta; sin embargo, a diferencia de lo esperado, en estos nódulos GUS sólo se expresó en las células no infectadas y en los haces vasculares (Figura 16e y 16f). Por el contrario, no se observan rastros de color azul en las células infectadas. Este resultado contrasta con lo que habíamos encontrado en la literatura. Forde et al. (1989) reportan que los nódulos de *L. corniculatus* transformados con una construcción similar no manifestaron actividad de GUS más que en los haces vasculares y ligeramente en la corteza interna. En cambio, en Szabados et al., (1990), encontramos que el promotor 35S se comportó constitutivamente, tiñéndose todas las células del nódulo.

	CLONA	H	R	N	NT/NS	
	pGN30-GB14	7.0	43.6	120.7	3.40	
	pGN30-GB16	6.0	75.8	544.5	15.34	
	pGN30-GB3a	11.0	102.4	27.4	0.77	
	pGN30-GB3c	8.0	138.6	30.7	0.86	
	p35S-GUS	22.809	0	5.711.2	5.803.4	163.48
	no transformada	silvestre	5.0	79.7	35.5	1.00

**Figura 15: Análisis fluorimétrico de la actividad de GUS en tejidos de plantas transgénicas**

Actividades dadas en (pmol 4-MU/mg prot/min)

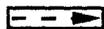
H=hoja; R=raíz; N=nódulo; NT=nódulo transgénico; NS=nódulo silvestre



Promotor de N-30



Región codificadora de GUS

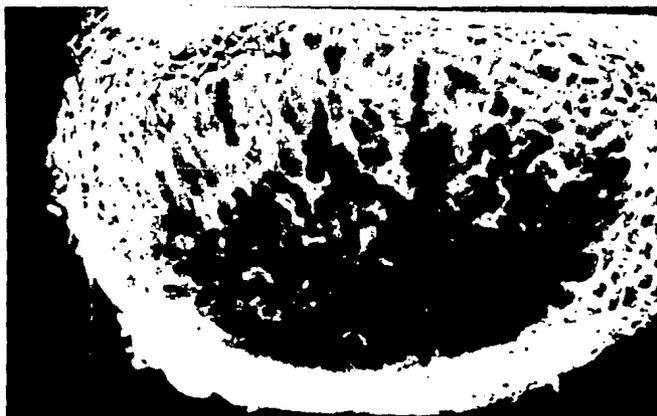


Promotor de 35S

(A)



(B)

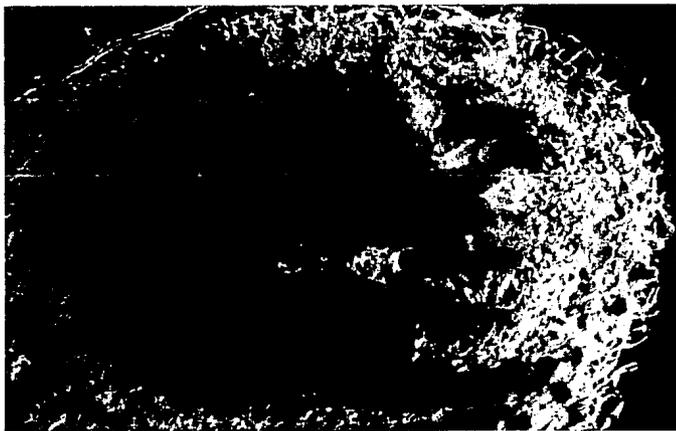


(C)

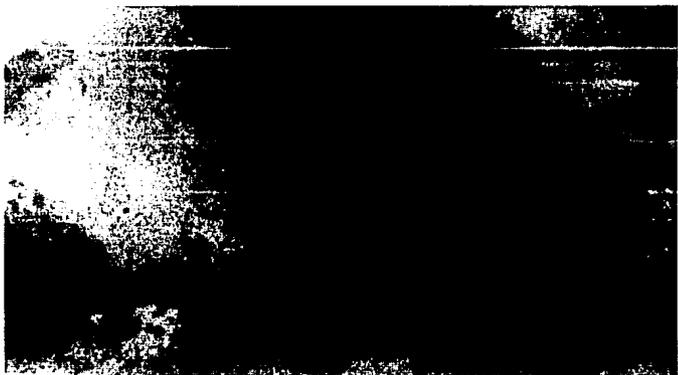




(E)



(F)



**Figura 16: Localización histoquímica de la actividad de GUS en nódulos de *Lotus corniculatus* transgénicos.** La coloración azul denota la localización de la actividad de GUS.

- (A) Nódulo silvestre, no se observa actividad de GUS. Las células infectadas se encuentran en la zona central del nódulo y se distinguen por ser de gran tamaño, por su coloración rojiza y por ser opacas a la luz. Las células no infectadas se encuentran en los espacios intersticiales, son más pequeñas y refringentes a la luz (x100).
- (B) Nódulo transformado con la construcción pGN30-GB1 (5' N-30 en la orientación correcta). La coloración azul de la actividad de GUS se encuentra sólo en las células infectadas (x100).
- (C) Nódulo transformado con la construcción pGN30-GB1, pero a un mayor aumento. Se observa la reacción de GUS sólo en las células infectadas (x400).
- (D) Nódulo transformado con la construcción pGN30-GB3. La tinción de GUS se aprecia en los haces vasculares, y en manchas indefinidas en una zona próxima a la corteza (x100).
- (E) Nódulo transformado con la construcción p35S-GUS. En este caso la coloración azul se aprecia solamente en las células no infectadas (x100).
- (F) Igual que en (E) pero a un mayor aumento (x400). Se puede observar que las células infectadas están claramente libres de actividad de GUS.

## DISCUSION

### I) Secuencia de la Región Codificadora de N-30:

La clona pGN338 fué secuenciada en su totalidad. En paralelo se secuenció la clona de cDNA pN311 (Campos et al., en preparación). Usando las dos secuencias, encontramos que N-30 tiene una alta homología con la familia de nodulinas de soya descrita por Sandal et al. (1987), Mauro et al. (1985), Jacobs et al. (1987) y Sengupta-Gopalan et al. (1986a). El extremo amino terminal de las secuencias de aminoácidos predichas para estas proteínas está bastante conservado en la familia de soya (95% homología), y aparentemente reúne los requisitos de un péptido líder. La comparación con la región correspondiente de la secuencia aminoacídica predicha para N-30 por la clona genómica, mostró un alto grado de homología con la familia de soya, especialmente con N-20, N-22 y N-27 (58%id., 11% sim.), incluyendo los aminoácidos del sitio propuesto de corte del péptido líder (Sandal et al., 1987; Jacobs et al., 1987) (Figura 11b). Además, el extremo amino de N-30 también muestra las características de un péptido líder: una región básica en el extremo amino, una región central hidrofóbica y una región más polar en el extremo carboxilo; cumpliendo la regla "-3, -1" de von Heijne (von Heijne, 1986) (Figura 10). Esto sugiere que podría tratarse de una proteína asociada a membrana. Sin embargo, en el caso de soya, la asociación con la membrana peribacteroidal sólo ha sido demostrada para N-23, en tanto que N-27 se encontró que reaccionaba con anticuerpos generados contra la fracción soluble del nódulo (Jacobs et al., 1987). Dada la semejanza que hay entre el extremo amino de N-30 y el de N-27 (56% identidad, 10% similitud), podría esperarse que compartieran la localización subcelular, lo cual parece ser confirmado por evidencias recientes, que sugieren que N-30 se encuentra también en la fracción soluble (Campos et al., en preparación).

Otra región de interés y bastante conservada entre las proteínas de la familia de soya (70-90%) es la que contiene dos dominios con una estructura C-X7-C-X13.14-C-X7-C. Se ha sugerido que las cisteínas podrían acomodarse en una configuración típica de los dominios que unen metales, conocidos generalmente como "dedos de zinc" (Sandal et al., 1987). Esta región se encuentra también conservada en N-30 respecto a las nodulinas de la familia de soya, destacando la alta homología (65% id., 9% sim.) y el espaciamiento correcto C-X7-C entre las cisteínas (Figura 11a). La fuerte conservación de secuencia entre proteínas de distintas especies de leguminosas, indica que esta zona debe ser importante para la función de las mismas. Analizándola de acuerdo a información más reciente, surge un mayor parecido con los motivos denominados "vuelta de zinc" ("zinc twist") encontrados en el receptor de glucocorticoides de rata y humano (Valle et al., 1991; Klug et al., 1987). En estas secuencias también se encuentran cuatro cisteínas

responsables de la unión al Zn, separadas por 15 aminoácidos; sin embargo, el espaciamento entre las cuatro cisteínas es sólo de 2pb. Estos motivos, así como otros dominios relacionados a los "dedos de zinc", han sido implicados en unión al DNA como factores transcripcionales, aunque esto ha sido demostrado solamente para unos pocos casos (por ejemplo GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*, GR de ratón, TFIIIA de *Xenopus*) (Berg, 1990, Valle et al., 1991). En el caso de las nodulinas de soya y frijol relacionadas con N-30, es poco probable que tengan un papel de este tipo, dado que son muy abundantes. Se ha sugerido que estas nodulinas pueden estar involucradas en el transporte de metales, funcionando tanto en el citosol como en la membrana y el espacio peribacteroidal (Sánchez et al., 1991). Sin embargo, no se ha demostrado la unión de estas proteínas a metales. Se podría pensar que las cisteínas están involucradas de alguna forma en la mantener configuración tridimensional de estas proteínas, y que esta es la razón de que estén conservadas.

Una última región de interés se encuentra en el extremo carboxilo de la sección de N-30 secuenciada. En la familia de nodulinas de soya esta región es rica en prolinas, especialmente en el caso de N-20 que tiene 8 prolinas contiguas (Sandal et al., 1987). En la secuencia aminoácídica derivada de la clona genómica incompleta de N-30 también encontramos un tramo de 10 prolinas sucesivas, en tanto que en la secuencia derivada de la clona de cDNA encontramos hasta 18 prolinas entre los últimos 30 residuos del extremo carboxilo. Se sabe que una abundancia de prolinas puede hacer que una proteína tenga una vida media corta (Rogers et al., 1986); por otro lado, pueden ser la causa de la migración aberrante de la N-30 en el gel de doble dimensión.

Al comparar esta secuencia con la de la clona de cDNA pN311 (Campos et al., en preparación), encontramos que la secuencia codificadora se interrumpe en la base +645 (a partir del ATG, tomando la A como +1), donde aparentemente se inicia un intrón, limitado por la secuencia consenso GT y que se extiende hasta el final de la clona pGN338 (Figura 7 y Figura 8). De acuerdo a la clona de cDNA faltaría la secuencia de DNA correspondiente a 16 aminoácidos (Figura 9). Suponemos que es un intrón, y no el final de la región codificadora, debido a que la secuencia de DNA diverge mucho a partir de ese punto, además de que encontramos el GT consenso en lo que sería el inicio del intrón (Figura 8). Por otro lado, en los genes secuenciados de la familia de soya relacionada a N-30 (N-20, N-22, N-23), se localiza un intrón aproximadamente en la misma zona (Sandal et al., 1987; Mauro et al., 1985). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que pN311 y pGN338 correspondan a los genes de dos proteínas de la misma familia, pero con un extremo carboxilo muy diferente entre sí, y que no contengan un intrón.

El resto de la secuencia se encuentra bastante conservado entre la clona de cDNA y la clona genómica (96%). Las diferencias las encontramos principalmente

hacia el extremo carboxilo, donde se encuentran en la secuencia de la clona de cDNA seis bases más en la posición +405 (respecto al ATG de la clona genómica), seis en (+615), y tres en (+622) (Figura 8). Esto nos sugiere que no codifican exactamente para la misma proteína. Las diferencias en las secuencias de DNA de ambas clonas se reflejan en las secuencias de aminoácidos predichas, encontrándose un 91.6% de identidad (0.49% de similitud) entre ellas (Figura 9). Hay que notar que dos de los aminoácidos diferentes se encuentran en las zonas más conservadas con las otras nodulinas. Todas estas discrepancias pueden deberse a que los bancos genómico y de cDNA no fueron hechos con la misma variedad de frijol. El de cDNA proviene del cultivar Negro Jamapa y el de DNA genómico del cultivar Saxa. También podría tratarse de dos genes pertenecientes a una familia multigénica, como lo sugieren las características de la(s) proteína(s) obtenida(s) por la traducción *in vitro* de RNA polisomal de nódulo, el hecho de que una sola clona de cDNA hibride con varios transcritos, el southern genómico (Campos et al., 1987) y la semejanza con proteínas de soya que conforman una familia.

## II) Expresión de los genes quiméricos en *Lotus corniculatus*:

La N-30 es una nodulina cuyo mRNA se encuentra abundantemente representado en el nódulo. Esto sugiere que el promotor de N-30 es muy fuerte para nódulo, ó que su mRNA es muy estable, y nos hizo pensar que un gene reportero bajo la dirección del promotor de N-30 iba a ser altamente expresado en el nódulo. Como puede observarse en las Figuras 15, 16b y 16c, la expresión nódulo-específica del gene quimérico N30-GUS no fué tan alta, por ejemplo en comparación con la expresión tan fuerte de GUS bajo el promotor de 35S (Figuras 15, 16e y 16f). Sin embargo, fué considerablemente mayor que en hoja ó raíz (Figura 15), y además, específica de células infectadas (Figura 16b y 16c). Se desconoce la razón de que la raíz presente más fondo que el tejido de hoja.

El nivel de expresión que encontramos puede deberse a varios factores. La clona de cDNA utilizada como sonda para obtener la clona genómica de N-30, se usó también para seleccionar por hibridación mRNA, que después fué traducido. El producto resultante de esta traducción fué abundante, y manifestó también la migración aberrante observada previamente para N-30 en el gradiente isoeléctrico, pero no se sabe si corresponde a la expresión de uno solo ó de varios genes (Campos et al., 1987). Como ha sido comentado anteriormente, hay varios datos que apuntan fuertemente a la existencia de una familia multigénica relacionada con la N-30. Cada uno de los miembros de esta familia podría tener distintas características, y su expresión estar regulada de manera diferente, como se observa en otras familias multigénicas, por ejemplo la de la leghemoglobina de soya (Verma et al., 1988; Uheda et al., 1982). Dado que en el caso de N-30 se desconoce la proporción en la que la expresión de cada gene contribuye al total de la proteína

observada, se desconoce también la fuerza de cada uno de los promotores. Por tanto, la fuerza del promotor del gene correspondiente a la clona pGN338 no puede ser inferida de la expresión observada para el conjunto de los genes de esta familia, pudiendo ser un promotor más débil.

Debido al tamaño del promotor usado (860pb), es posible que falten elementos de control positivos localizados más arriba de este punto. Sin embargo, la región del promotor de N-30 contiene aparentemente todas las secuencias necesarias para la expresión en nódulo, encontrándose tanto las secuencias consenso órgano-específicas CTCTT y AAAGAT (Sandal et al., 1987; Stougaard et al., 1987b), como los motivos que unen factores nucleares en otras nodulinas (consenso TATTTWAT) (Jensen et al., 1988a,b; de Bruijn et al., 1988; Forde et al., 1990; Jacobsen et al., 1990) (Figura 7 y Figura 12). Estas secuencias se encuentran distribuidas de manera diferente en los promotores de nodulinas tardías: mientras que el promotor de *lbc3* requiere de 1 kb para contener todos los elementos *cis* necesarios para la expresión del gene (Stougaard et al., 1987b; Jensen et al., 1988), el promotor de N-23 presenta un arreglo más compacto, estando todos sus elementos de control localizados en menos de 350pb (Jorgensen et al., 1988, 1991) (Figura 12). Las secuencias correspondientes a los repetidos invertidos InvA e InvB del promotor de N-23 no se encontraron en el promotor de N-30. Sin embargo, aunque su función como elementos positivos del promotor de N23 ha sido establecida, no es claro que constituyan motivos transcripcionales comunes a las otras nodulinas de esa familia, dado que su ausencia no parece ser crítica en la expresión de las mismas (Jorgensen et al., 1991).

Otra posibilidad es que hayan hecho falta secuencias regulatorias de la región 3' no transcrita del gene. Pero esta zona no parece tener mucha importancia en la expresión de los genes de otras nodulinas, ya que aunque se ha reportado que existen secuencias conservadas entre el 3' de varios genes de leghemoglobina de soya (Kuhse et al., 1987), éstas no parecen influir en el control de la expresión (Stougaard et al., 1987).

Por otro lado, para hacer la fusión transcripcional, se usó el único sitio de restricción disponible en la zona (14pb hacia abajo de la caja TATA), por lo que el sitio normal de la transcripción no está incluido en el gene quimérico pGN30-GB1. De esta manera se alteró el sitio de inicio de la transcripción, quedando en su lugar las secuencias del "pollinker". Esta perturbación pudo hacer que la transcripción se haya llevado a cabo de manera menos eficiente, ó que el RNA quimérico resultante haya sido poco estable por alguna razón. Para evitar este problema se creó un nuevo sitio de restricción 5 bases arriba del ATG por mutagénesis dirigida. Usando este sitio se está construyendo otro gene quimérico que incluya el sitio normal de la transcripción; esta construcción aún no ha sido introducida a *Lotus*.

Finalmente, no hay que olvidar que el gene quimérico 5'N30-GUS fué introducido en un sistema heterólogo. Aunque este sistema ha sido validado ya al expresar correctamente varios genes de otras especies, siempre cabe la posibilidad de que las diferencias en las señales de expresión en *Lotus* repercutan en la expresión del gene quimérico.

La expresión nódulo específica del gene pN30-GB1 contrasta en especial con la del gene quimérico 35S-GUS. Como se puede observar en las Figuras 16e y 16f, 35S-GUS sólo se expresa en células no infectadas, a diferencia de lo reportado por Szabados et al. (1990) (expresión en todas las células) y por Forde et al. (1989) (expresión sólo en haces vasculares). Esta expresión característica la observamos por lo menos en los nódulos de dos plantas transformadas individualmente, pero no en todos los cortes de los mismos, habiendo algunas preparaciones más gruesas que se veían completamente azules. Esto explicaría la discrepancia con lo reportado por Szabados, pero no por Forde, donde se muestra claramente una expresión parcialmente distinta para este gene quimérico.

Los resultados obtenidos con el gene 35S-GUS nos permiten de alguna manera validar más aún la expresión específica de nódulo de pGN30-GB1, ya que descarta artefactos inherentes al método, (como la posibilidad de que el reactivo por alguna razón no entrara a todas las células con la misma facilidad, ó que se viera la expresión de GUS sólo en las células infectadas debido a una transcripción más intensa en ellas respecto a las no-infectadas).

En cuanto a la expresión del gene quimérico pGN30-GB3, no se detectó actividad de GUS en ningún ensayo fluorimétrico, ni en la mayoría de los cortes de nódulos analizados. Este era el resultado esperado, ya que se invirtió la orientación del promotor a partir de la caja TATA, y no se pensaba que pudiera dirigir la expresión de GUS en ningún tejido. No obstante, en un nódulo se vieron algunas zonas teñidas, que parecen ser los haces vasculares. Se tienen reportes de alteraciones de la expresión al cambiar segmentos de la región regulatoria del promotor de *lbc3* de soya, que normalmente se expresa en células infectadas del nódulo. Un gene quimérico construido con el promotor casi completo de *lbc3* (-162 a -1914) fusionado al promotor truncado de 35S (-90 a +9) frente a GUS, se expresó en los haces vasculares del nódulo y la raíz; mientras que otra construcción semejante, pero con el promotor truncado de *nos* (-150 a +1), se expresó en zonas pequeñas de los haces vasculares y de la corteza del nódulo (Szabados et al., 1990). Pero en estos dos casos la sección de promotor conservada se encontraba en la orientación correcta, y la región faltante se sustituyó por un promotor mínimo heterólogo, de manera que se mantuvieron todos los elementos necesarios para la expresión, aunque haya cambiado la localización. Pero en el caso del gene pGN30-GB3 se debe haber tenido que hacer uso de secuencias del promotor proximal crípticas (caja TATA, etc.) para que GUS se expresara, aunque la

expresión haya sido mínima. Sin embargo, la expresión de GUS no fué del todo inespecífica, ya que se mantuvo limitada al nódulo. Esto nos sugiere que alguno de los elementos responsables de la órgano-especificidad de la expresión es capaz de funcionar en la dirección opuesta y a una distancia diferente de la que tiene normalmente, reuniendo las características de un "enhancer". Se tendrá que hacer una caracterización más fina de este promotor para determinar si hay ó no un elemento "enhancer" en él y definir su posición.

Los resultados obtenidos en el ensayo fluorimétrico (Figura 15) nos indican que la actividad de GUS dirigida por el promotor de N-30 es unas 50 veces mayor en nódulo que en hoja, y entre 3 y 7 veces mayor que en raíz. Además podemos observar en las Figuras 16b y 16c que la actividad de GUS en los nódulos transformados con la construcción pN30-GB1 (5'N30-GUS) es claramente específica de las células infectadas. De acuerdo a la expresión dirigida en *Lotus corniculatus* por el promotor de su gene, podemos concluir que la N-30 codificada por la clona pGN338 es una proteína específica de nódulo, donde posiblemente juega un papel importante en el funcionamiento de las células infectadas.

## BIBLIOGRAFIA

- APPLEBY CA. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 443-478
- BENFEY PN, Chua N-H. (1989). Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244:174-181
- BENNET MJ, Lightfoot DA, Cullimore JV. (1989). cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase gamma polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol Biol* 12: 553-565
- BENNET MJ, Cullimore JV (1989b) Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L: subunit composition in developing root nodules and plumules. *Planta* 179: 433-440
- BERG JM. (1990). Zinc finger domains: hypotheses and current knowledge. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 19: 405-421
- BERGMANN H, Preddie E, Verma DPS (1983) Nodulin 35: A subunit of specific uricase (uricase II) localized in uninfected cells of nodules. *EMBO J* 2: 2333-2339
- BEVAN M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl Acids Res* 12: 8711-8721
- BOJSEN K, Abildsten D, Jensen EO, Paludan K, Marcker KA. (1983). The chromosomal arrangement of six soybean leghemoglobin genes. *EMBO J* 2: 1165-1168
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- BROUGHTON WJ, Dilworth M. (1971). Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* 125: 1075-1080
- de BRUIJN FJ, Jensen EO, Metz BA, Hoffman H-J, Welters P, Marcker KA, Schell J. (1988). Interaction of *trans*-acting factors with distinct DNA elements in the promoter regions of the *Glycine max* and *Sesbania rostrata* leghemoglobin genes. In: *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Palacios R, Verma DPS (eds.) St. Paul, MN; APS Press; The American Phytopathological Society. pp 333-339
- de BRUIJN FJ, Felix G, Grunenberg B, Hoffman HJ, Metz B, Ratet P, Simons-Schreier A, Szabados L, Welters P, Schell J. (1989). Regulation of plant genes specifically induced in nitrogen fixating nodules: role of *cis*-acting elements and *trans*-acting factors in leghemoglobin gene expression. *Plant Mol Biol* 13: 319-325
- de BRUIJN FJ, Szabados L, Schell J. (1990). Chimeric genes and transgenic plants are used to study the regulation of genes involved in symbiotic plant-microbe interactions (Nodulin genes) *Dev Gen* 11: 182-196
- CAMPOS F, Padilla J, Vázquez M, Ortega JL, Enríquez C, Sánchez F. (1987). Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol Biol* 9: 521-532

- CHILTON MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempe J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295: 432-434
- CHUNG CT, Niemela SL, Miller RH. (1989). One-step preparation of competent *E. coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*
- DAVEY MR, Rech EL, Mulligan BJ (1989). Direct DNA transfer to plant cells. *Plant Mol Biol* 13: 273-285
- DAVID C, Chilton MD, Tempe J. (1984). Conservation of T-DNA in plants regenerated from "hairy" root cultures. *Biotech* 2: 73-76
- DEAK M, Kiss GB, Koncz C, Dudits D. (1986). Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep* 5: 97-100
- DITTA G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. (1980). Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7347-7351
- DUNN K, Dickstein R, Feinbaum R, Burnett BK, Peterman TK, Thoidis G, Goodman HM, Ausubel FM. (1988). Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* 1: 66-74
- EAPEN S, Köhler F, Gerdemann M, Schieder O. (1987). Cultivar dependence of transformation rates in moth bean after co-cultivation of protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor Appl Genet* 75: 207-210
- FORDE BG, Day HM, Turton JF, Wen-jun S, Cullimore JV, Oliver JE. (1989). Two glutamine synthetase genes from *Phaseolus vulgaris* L display contrasting developmental and spatial patterns of expression in transgenic *Lotus corniculatus* plants. *Plant Cell* 1: 391-401
- FORDE BG, Freeman J, Oliver JE, Pineda M (1990). Nuclear factors interact with conserved A/T-rich elements upstream of a nodule-enhanced glutamine synthetase gene from French Bean. *Plant Cell* 2: 925-939
- FORTIN MG, Morrison NA, 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
- GARCIA JA, Hille J, Goldbach R. (1986). Transformation of cowpea *Vigna unguiculata* cells with an antibiotic resistance gene using a Ti-plasmid derived vector. *Plant Science* 44: 37-46
- GORDON-KAMM WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams WR, Willits NG, Rice TB, Mackey CJ, Krueger RW, Kausch AP, Lemaux PG (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618
- GOTOH O. (1982). An improved algorithm for matching biological sequences. *J Mol Biol* 162: 705-708
- GRIFFITH SM, Vance CP. (1989). Aspartate aminotransferase in alfalfa root nodules: purification and partial characterization. *Plant Physiol* 90: 1622-1629

- HANSEN J, Jørgensen JE, Stougaard J, Marcker KA. (1989) Hairy roots—a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Rep* 9: 12-15
- von HEIJNE G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl Acids Res* 14: 4683-4690
- HERRERA-ESTRELLA L, Depicker A, Van Montagu M, Schell J (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. *Nature* 303: 209-213
- HINCHEE MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SS. (1988). Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *BioTechnology* 6: 915-922
- HIREL B, Bouet C, King B, Layzell D, Jacobs F, Verma DPS. (1987). Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J* 6: 1167-1171
- HOOYKAS PJJ. (1989). Transformation of plant cells via *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol* 13: 327-336
- HORVATH B, Bachem CW, Schell J, Kondorosi A. (1987). Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal, interacting with the *nod D* gene product. *EMBO J* 6: 841-848
- JACOBS FA, Zhang M, Fortin MAG, 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 NA, Jensen EO, Marcker A, Poulsen C, Marcker KA. (1990). HMG I-like proteins from leaf and nodule nuclei interact with different AT motifs in soybean nodulin promoters. *Plant Cell* 2:85-94
- JEFFERSON RA. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405
- JEFFERSON RA, Kavanagh TA, Bevan M. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- JENSEN EO, Marcker KA, Schell J, de Bruijn F. (1988a). Interaction of a nodule specific *trans*-acting factor with distinct DNA elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* 5' upstream region. *EMBO J* 7: 1265-1271
- JENSEN EO, Stougaard JJ, Jørgensen JE, Sandal N, de Bruijn FJ, Schell J, Marcker KA. (1988b). Regulation of nodule-specific plant genes. En: *Nitrogen Fixation. Hundred years after*. Bothe H, de Bruijn FJ and Newton WE(eds.) Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag pp 351-356
- JØRGENSEN JE, Stougaard J, Marcker A, Marcker KA. (1988). Root nodule specific gene regulation: analysis of the soybean N-23 gene promoter in heterologous symbiotic systems. *Nucl Acids Res* 6: 39-50
- JØRGENSEN JE, Stougaard J, Marcker KA. (1991). A two-component nodule-specific enhancer in the soybean N-23 gene promoter. *Plant Cell* 3: 819-827
- JOSHI CP. (1987). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucl Acids Res* 15: 9627-9635

- van KAMMEN A. 1984. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2:43-45
- de KATHEN A, Jacobsen H-J. (1990) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pisum sativum* L. using binary and cointegrate vectors. *Plant Cell Rep* 9: 276-279
- KATINAKIS P, Verma DPS. (1985) Nodulin 24- of soybean codes for a peptide 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
- KLEIN TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73
- KLUG A, Rhodes D. (1987) "Zinc fingers" a novel protein motif for nucleic acid recognition. *TIBS* 12: 462-467
- KONIECZNY A, Szczyglowski K, Boron L, Przybylska M, Legocki AB. (1988). Expression of lupin nodulin genes during root nodule development. *Plant Sci* 55: 145-149
- KOSTER-TOPFER M, Frommer WB, Rocha-Sosa M, Rosahl S, Schell J, Willmitzer L. (1989). A class II patatin promoter is under developmental control in both transgenic potato and tobacco plants. *Mol Gen Genet* 219: 390-396
- KUHLEMEIER C, Green PJ, Chua N-H. (1987). Regulation of gene expression in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* 38: 221-257
- KUHSE J, Pühler A. (1987). Conserved sequence motifs in the untranslated 3' end of leghemoglobin transcripts isolated from broadbean nodules. *Plant Science* 49:137-143
- LARA M, Cullimore JV, Lea PJ, Miflin BJ, Johnston AWB, Lamb JW. (1983). Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157: 254-258
- LARA M, Porta H, Padilla J, Folch J, Sánchez F. (1984). Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 76: 1019-1023
- LARSEN K, Jochimsen BU. (1986) Expression of nodule-specific uricase in soybean callus tissue is regulated by oxygen. *EMBO J* 5: 15-19
- LEGOCKI RP, Verma DPS. (1979). A nodule-specific plant protein (Nodulin-35) from soybean. *Science* 205: 190-193
- LEROUGE P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé J-C, Dénarié J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784
- LONG SR. (1989) *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56: 203-214
- MANIATIS T, Fritsch EF, Sambrook J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- MARIOTTI D, Fontana GS, Santini L. (1989). Genetic transformation of grain legumes: *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *J Genet Breed* 43:77-82

- MAURO VP, Nguyen T, Katinakis P, Verma DPS. (1985) Primary structure of the soybean nodulin-23 gene and potential regulatory elements in the 5'-flanking regions of nodulin and leghemoglobin genes. *Nucl Acids Res* 13: 239-249
- McCABE DE, Swain WE, Martinell BJ, Christou P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *BioTechnology* 6: 923-926
- McCLEAN P, Chee P, Held B, Simental J, Drong RF, Slightom J. (1991). Susceptibility of dry bean *Phaseolus vulgaris* L to *Agrobacterium* infection: transformation of cotyledonary and hypocotyl tissues. *Plant Cell Tissue and Organ Cult* 24: 131-138
- METZ BA, Welters P, Hoffman HJ, Jensen EO, Schell J, de Bruijn FJ. (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
- NAP JP, Bisseling T. (1990a) Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948-954
- NAP JP, Bisseling T. (1990b). Nodulins and nodulin gene regulation in root nodule development: Overview and discussion. En. *The molecular biology of symbiotic nitrogen fixation*. PM Gresshoff (ed) Boca Ratón, Florida: CRC Press pp 181-229
- NGUYEN T, Zelechowska MG, Foster V, Bergmann H, Verma DPS. (1985). Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding nodule-specific uricase II localized in peroxisomes of uninfected cells of soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5040-5044
- PADILLA JE, Campos F, Corde V, Lara M, 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 JE, Miranda J, Sánchez F. (1991). Nodulin regulation in common bean nodules induced by bacterial mutants. *Mol Plant-Microbe Interact*
- PETIT A, Stougaard J, Kuhle, Marcker KA, Tempé J. (1987). Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol Gen Genet* 207: 245-250
- PICKARDT T, Meixner M, Schade V, Schieder O. (1991). Transformation of *Vicia narbonensis* via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Plant Cell Rep* 9: 535-538
- POTRIKUS I. (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 205-225
- PUONTI-KAERLAS J, Stabel P, Eriksson T. (1999). Transformation of pea *Pisum sativum* L. by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 8: 321-324
- QUISPÉL A. (1988). Hellriegel and Wilfarth's discovery of (symbiotic) nitrogen fixation hundred years ago. En: *Nitrogen Fixation: Hundred years after*. Bothe H, de Bruijn FJ and Newton WE (eds.) Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag pp 3-12

- ROCHE P, Lerouge P, Promé J-C, Faucher C, Vasse J, Maillet F, Camut S, De Billy F, Dénarié J, Truchet G. (1991a). NodRm1, a sulphated lipo-oligosaccharide signal of *Rhizobium meliloti* elicits hair deformation, cortical cell division, and nodule organogenesis on alfalfa roots. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* H Hennecke and DPS Verma (eds.) Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers pp 119-126
- ROCHE P, Debelle F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Dénarié J, Promé J-C. (1991b) Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67: 1131-1143
- ROGERS S, Wells R, Rechsteiner M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368
- SALISBURY FB, Ross CW (1985) *Plant Physiology*. Wadsworth, Inc. pp 252-256
- SANCHEZ F, Campos F, Padilla J, Bonneville J-M, Enríquez C. (1987). Purification, cDNA cloning, and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 84: 1143-1147
- SANCHEZ F, Padilla JE, Pérez H, Lara M (1991) Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 507-528
- SANDAL NN, Bojsen K, Marcker KA. (1987). A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucl Acids Res* 15: 1507-1519
- SANGER F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- SCHELL JS. (1987) Transgenic plants as tools to study the molecular organization of plant genes. *Science* 237: 1176-1183
- SCHELL J, John M, Schmidt J, Wingerder-Drissen R, Simons A, Metz B, Jensen EO, Hoffman H-J, Welters P, de Bruijn FJ. (1988). Regulation of gene expression in plants with special emphasis on the nodulation process. En: *Nitrogen Fixation: Hundred years after*. Bothe H, de Bruijn FJ and Newton WE (eds.). Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag pp 591-598
- SCHERES B, van Engelen F, van der Knaap E, van de Wiel C, van Kammen A, and Bisseling T. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* 2: 687-700
- SCHILLING G. 1988. Hellriegel and Wilfarth and their discovery of nitrogen fixation at Bernburg. En: *Nitrogen Fixation: Hundred years after*. Bothe H, de Bruijn FJ and Newton WE (eds.). Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag pp 13-20
- SENGUPTA-GOPALAN C, Pitas JW, Thompson DV, Hoffman LM. (1986a). Expression of host genes during nodule development in soybeans. *Mol Gen Genet* 203: 410-420
- SENGUPTA-GOPALAN C, Pitas JW. (1986b). Expression of nodule-specific glutamine synthetase genes during nodule development in soybeans. *Plant Mol Biol* 7: 189-199

- SPAINK HP, Wijffelman CA, Pees E, Okker RJH, Lugtenberg BJJ. (1987). *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328: 337-340
- SPAINK HP, Sheeley DM, van Brussel AAN, Glushka J, York WS, Tak T, Geiger O, Kennedy EP, Reinhold VN, Lugtenberg BJJ (1991) A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354: 125-130
- SPAINK HP, Aarts A, Stacey G, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ, Kennedy EP. (1992). Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol Plant-Microbe Interact* 5: 72-80
- SPRENT JJ, Sprent P. (1990) *Nitrogen Fixing Organisms*. Chapman and Hall. pp 30-63
- STOCKHAUS J, Schell J, Willmitzer L. (1989) Correlation of the expression of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1 with the presence of chloroplasts. *EMBO J* 8: 2445-2451
- STOUGAARD JJ, Marcker KA, Otten L, Schell J. (1986). Nodule-specific expression of a chimeric soybean leghemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* 321: 669-674
- STOUGAARD JJ, Abildsten D, Marcker KA (1987a). *Agrobacterium rhizogenes* pRI TL-DNA segment as a gene vector system for transformation of plants. *Mol Gen Genet* 207: 251-255
- STOUGAARD JJ, Sandal NN, Gron A, Kühle A, Marcker KA. (1987b). 5' Analysis of the soybean Leghemoglobin *lbc3* gene regulatory elements required for promoter activity and organ specificity. *EMBO J* 6: 3565-3569
- STOUGAARD JJ, Jørgensen JE, Christensen T, Kühle A, Marcker KA. (1990). Interdependence and nodule specificity of *cis*-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and N-23 gene promoters. *Mol Gen Genet* 220: 353-360
- SZABADOS L, Ratet P, Grunenberg B, de Bruijn FJ. (1990). Functional analysis of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *g1b3* gene 5'-upstream region in transgenic *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell* 2: 973-986
- TABAEIZADEH Z (1989). Genetic transformation of a pasture legume, *Lotus corniculatus*, L. (Birdsfoot trefoil). *Biotech Letters* 11: 411-416
- TEPFER D. (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37: 959-967
- THUMMLER F, 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
- TINGEY SV, Walker EL, Coruzzi GM. (1987). Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J* 6: 1-9

- UHEDA E, Syono K. (1982). Physiological role of leghaemoglobin heterogeneity in pea root nodule development. *Plant Cell Physiol* 23:75-84
- VALLEE BL, Coleman JE, Auld DS. (1991) Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 999-1003
- VERMA DPS, Delauney AJ (1988). Root nodule symbiosis: Nodulins and nodulin genes. En: *Plant gene research: Temporal and spatial regulation of plant genes*. Verma DPS and Goldberg RB (eds.). Wien-New York: Springer-Verlag pp 169-199
- VERMA DPS, Fortin MG, Stanley J, Mauro VP, Purohit S, Morrison N. (1986). Nodulin and nodulin genes of *Glycine max*. *Plant Mol Biol* 7: 51-61
- VINCENT JM. 1980. Factors controlling the *Rhizobium* symbiosis. En: *Nitrogen Fixation*. W.E. Newton, W.H. Orme-Johnson, (eds.) University Park Press, Baltimore. 2: 103-122
- WELTERS SP, Metz BA, Schell J, de Bruijn FJ. (1989). Nucleotide sequence of a *Sesbania Rostrata* leghemoglobin gene. *Nucl Acids Res* 17: 1253-1258
- WHITE DWR, Greenwood D. (1987). Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. *Plant Mol Biol* 8: 461-469
- ZAMBRYSKI P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 2: 2143-2150

## AGRADECIMIENTOS (los que se olvidaron al principio)

A Federico, Mario y Agustín, por oírme ochenta veces el mismo rollo, discutiendo y comentando el avance (a veces de tortuga ó cangrejo) de la N-30.

A Ale Cova, Plinio, Lorenzo, Ale Bravo y Federico por revisar y discutir la tesis, y por sus valiosas aportaciones al trabajo.

A Blanca, por sus excelentes cortes de nódulos.

A Pancho y Paty, por ayudarme en mil experimentos.

A Jaime, por tolerar (y también contestar) todas mis preguntas de la PC.