

00361 <sup>23</sup>/<sub>24</sub>

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



---

---

FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios de Posgrado

TRANSFORMACION GENETICA DE  
PLANTAS LEGUMINOSAS MEDIADA  
POR *Agrobacterium rhizogenes*: UN  
MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA  
FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARIO RAMIREZ YAÑEZ

Directora de Tesis:

Dra. Georgina Hernandez Delgado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1993



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**TRANSFORMACION GENETICA DE PLANTAS LEGUMINOSAS MEDIADA POR  
*Agrobacterium rhizogenes*; UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA FIJACION  
SIMBIOTICA DEL NITROGENO**

**INDICE DE CONTENIDO**

**RESUMEN**

**INTRODUCCION**

1

**I. Fijación Biológica del Nitrógeno.**

1

**I.1. Fijación simbiótica de nitrógeno.**

2

**I.1.1. Proceso de nodulación.**

2

**I.1.2. Genética bacteriana de la fijación de nitrógeno.**

4

**I.1.3. Señales moleculares y reconocimiento.**

6

**II. Sistemas de Transformación Genética Vegetal.**

10

**II.1. Transferencia directa de DNA.**

10

**II. 2. Transformación mediada por *Agrobacterium*.**

13

**II.2.1 Vectores para transformación.**

17

**II.2.2 Metodología general de transformación mediada por  
*Agrobacterium*.**

19

**II.3. Transformación genética de plantas leguminosas**

20

**OBJETIVOS**

22

**I. Objetivos Generales.**

23

**II. Objetivos Específicos.**

23

<b>MATERIALES Y METODOLOGIA</b>	<b>25</b>
I. Material Biológico.	25
I.1. Material vegetal.	25
I.2. Cepas bacterianas.	25
I.3. Plásmidos.	26
II. Medios de cultivo.	26
III. Obtención de plantas transgénicas de <i>Lotus</i> .	27
IV. Obtención de plantas "compuestas" de <i>Lotus</i> y alfalfa.	28
V. Nodulación de plantas transgénicas de <i>Lotus</i> y plantas "compuestas" de <i>Lotus</i> y alfalfa.	29
VI. Determinación de la actividad de $\beta$ -Glucuronidasa.	30
VI.1. Ensayo fluorométrico.	30
VI.2. Ensayo histoquímico y microfotografías.	31
VII. Actividad de la nitrogenasa.	31
VIII. Caracterización de la eficiencia de la simbiosis de diferentes variedades de alfalfa.	32
IX. Obtención de exudados radiculares de alfalfa.	33
 <b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	 <b>34</b>
I. Construcción del gene quimérico con el promotor nódulo específico de la Leghemoglobina de soya.	34
II. Análisis de la expresión de GUS en plantas transgénicas de <i>Lotus</i> .	35
III. Análisis de la expresión de GUS en plantas "compuestas" de <i>Lotus</i> .	39
IV. Obtención de plantas "compuestas" de Alfalfa.	40
 <b>CONCLUSIONES</b>	 <b>43</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>45</b>

## RESUMEN

La fijación simbiótica de nitrógeno, que es la reducción de  $N_2$  atmosférico hasta amonio, es realizada entre plantas de la familia de las leguminosas y bacterias del suelo pertenecientes al género *Rhizobium*. Esta actividad se lleva a cabo mediante una estructura o "nuevo órgano" llamado nódulo, el cual se desarrolla en el sistema radical de la planta. Esta actividad simbiótica induce, tanto en la planta como en la bacteria, la expresión de un conjunto de genes que actúan de manera coordinada.

El desarrollo de las técnicas de transformación genética vegetal ha permitido, entre otros aspectos, el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de un gene específico en plantas.

El objetivo principal de este trabajo fué el establecer el sistema modelo de transformación para leguminosas, de *Lotus corniculatus* mediado por *Agrobacterium rhizogenes*, y obtener tanto plantas transgénicas como plantas "compuestas" (en las cuales sólo la raíz este transformada). Las plantas transgénicas y "compuestas" fueron noduladas con *Rhizobium loti* NZP2037, y la efectividad de la simbiosis se evaluó midiendo la actividad de nitrogenasa.

Para la transformación de las plantas se planteó usar, tanto un sistema binario de transformación como un sistema de transformación cointegrado (donde se espera que la expresión del gene marcador sea del 100%). Además, se analizó la expresión del gene marcador de la  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS), bajo la dirección de un promotor constitutivo fuerte (35S) y, también bajo la dirección de un promotor específico de nódulo (el promotor de la leghemoglobina de soya). Para esto último, se contruyó un gene quimérico fusionando el promotor de la leghemoglobina de soya a la región codificadora de la  $\beta$ -glucuronidasa.

Los resultados muestran que el porcentaje de infección (número de raíces transformadas que aparecieron en las plantas, contra el número total de plantas que fueron infectadas) es de 18.9%, 19.6% y 28.2% para la cepa de *A. rhizogenes* conteniendo los plásmidos pMR1, PBI121 y pRi12, respectivamente. La cotransformación se determinó con base a las plantas transgénicas que presentaron actividad de GUS, por ensayos fluorométricos e histológicos, obteniendo valores cercanos al 50% para los sistemas binarios. Las plantas transgénicas y "compuestas" de *Lotus* fueron capaces de establecer simbiosis con *Rhizobium loti*, y se detectó actividad de nitrogenasa. Los valores de expresión de GUS fueron muy variables entre los individuos transgénicos. La actividad de GUS solo se manifestó en el nódulo cuando su expresión

estuv6 dirigida por el promotor n6dulo espec6fico, y se detect6 en todos los tejidos de las plantas transg6nicas, cuando estas presentaban el pl6smido con el promotor constitutivo 35S.

El segundo objetivo fue implementar el sistema de obtenci6n de plantas "compuestas" de *Lotus*, en alfalfa.

Se analiz6 la eficacia de la simbiosis en diferentes variedades de alfalfa, y se observaron diferentes capacidades de nodulaci6n y fijaci6n de nitr6geno entre ellas. La variedad Valenciana, fue la que mejor capacidad de nodulaci6n present6, por lo que pl6ntulas de esta variedad fueron utilizadas para ser infectadas con *Agrobacterium rhizogenes*. El porcentaje de infecci6n fue de 9% y aument6 hasta un 36% cuando la cepa de *Agrobacterium* creci6 en presencia de acetosiringona 50  $\mu$ M.

No se logr6 la nodulaci6n de las plantas "compuestas" de alfalfa, cuando estas fueron inoculadas con *Rhizobium meliloti* 2011.

## INTRODUCCION

### I. FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO.

El nitrógeno ( $N_2$ ) es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre, representa el 80% de los gases que la forman; sin embargo, las plantas y los animales son incapaces de utilizarlo como tal para crecer; sólo las bacterias fijadoras de nitrógeno lo usan, reduciéndolo a amonio ( $NH_4$ ) y aumentando, de esta manera, la cantidad de formas nitrogenadas útiles en la biósfera. A la conversión de  $N_2$  a  $NH_4$  por los seres vivos se le denomina **fijación biológica de nitrógeno** (Long, 1989 y Christopher et al., 1983).

Debido a su escasez en la biosfera, el nitrógeno disponible en el suelo para ser utilizado por las plantas es uno de los factores que limitan la agricultura; es por ésto que los suelos deben ser fertilizados constantemente. Sin embargo, la utilización de fertilizantes nitrogenados, cuya demanda es cada vez mayor, presenta dos grandes inconvenientes: su producción comprende un proceso de alto consumo de energía, lo cual hace muy costosa su utilización y, segundo, estos fertilizantes producen efectos negativos cuando se usan indiscriminadamente, porque al ser transformados en nitratos ocasionan la eutricación de los cuerpos de agua y la contaminación de los mantos freáticos. Esto ha dado lugar a que se concentre la atención en el estudio de la **fijación biológica del nitrógeno**, como una alternativa para el incremento y mejoramiento de la producción agrícola (Rocha y De Las Peñas, 1990).

La fijación biológica del nitrógeno, es un proceso natural de gran importancia ecológica que realiza un número limitado de organismos procariontes. En la naturaleza, la fijación biológica de  $N_2$ , que es la reducción de nitrógeno atmosférico hasta amonio, por medio de la acción de la enzima nitrogenasa, es realizada por organismos de vida libre como *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii* y *Clostridium pasteurianum*, así como por fijadores simbióticos como lo son las bacterias del género *Rhizobium* y, actinomicetes del género *Frankia* cuya simbiosis se establece con árboles del género *Alnus* y *Casuarina* entre otros.

La mayor parte del nitrógeno fijado biológicamente, disponible para la agricultura, proviene principalmente de la asociación simbiótica que existe entre los rhizobia (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) y las raíces de las leguminosas.

Este proceso se lleva a cabo en una estructura diferenciada denominada **nódulo**, en el cual se fija el nitrógeno atmosférico como amonio, compuesto que es proporcionado a la planta. Este proceso, que hace innecesaria la fertilización, presenta dos aspectos fundamentales: (1) se realiza casi exclusivamente en plantas de la familia de las leguminosas y, (2) es muy específico, es decir, una especie de bacteria habitualmente se asocia solamente a un tipo de leguminosa. El estudio de la simbiosis entre *Rhizobium* y las leguminosas, además de ser un proceso fascinante que implica la relación entre un organismo eucarionte (leguminosa) y un organismo procarionte (*Rhizobium*), tiene un enorme potencial en la agricultura (Jan y Bisselling, 1990 y Djordjevic et al., 1987).

## **I.1 FIJACION SIMBIOTICA DEL NITROGENO**

### **I.1.1. PROCESO DE NODULACION.**

Para que se realice la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, y se fije el nitrógeno, es necesario que la bacteria penetre los pelos radicales de las raíces de las leguminosas. Dicho proceso comprende diferentes niveles: (Denarie y Roche, 1992; Rocha De Las Peñas, 1990).

- 1) Colonización de la superficie de la raíz.
- 2) Deformación y enroscamiento de los pelos radicales.
- 3) Mitosis de las células de la corteza de la raíz.
- 4) Penetración de las bacterias a través de los pelos radicales por el "hilo de infección", división y proliferación de las bacterias.
- 5) Formación del nódulo.
- 6) Liberación de las bacterias del **hilo de infección**, dentro del nódulo, rodeadas por una membrana de origen vegetal llamada **membrana peribacteroidal**.
- 7) Diferenciación de las bacterias en bacteroides y fijación del nitrógeno.
- 8) Funcionamiento del nódulo, estabilidad, persistencia y,
- 9) Síntesis de proteínas nódulo-específicas (**nodulinas**) (Denarie, 1992; Sánchez et al., 1991; y Rocha y De Las Peñas, 1990) (Fig. 1).

Los rhizobia pueden ocupar básicamente toda la superficie del sistema radical de las leguminosas y adherirse preferentemente a los pelos radicales, pero la interacción simbiótica sólo se inicia cuando algunas de las bacterias adecuadas entran en contacto con una zona susceptible de la raíz de su hospedero (Fig. 1). Esta zona se localiza entre el ápice de la raíz y el pelo radical



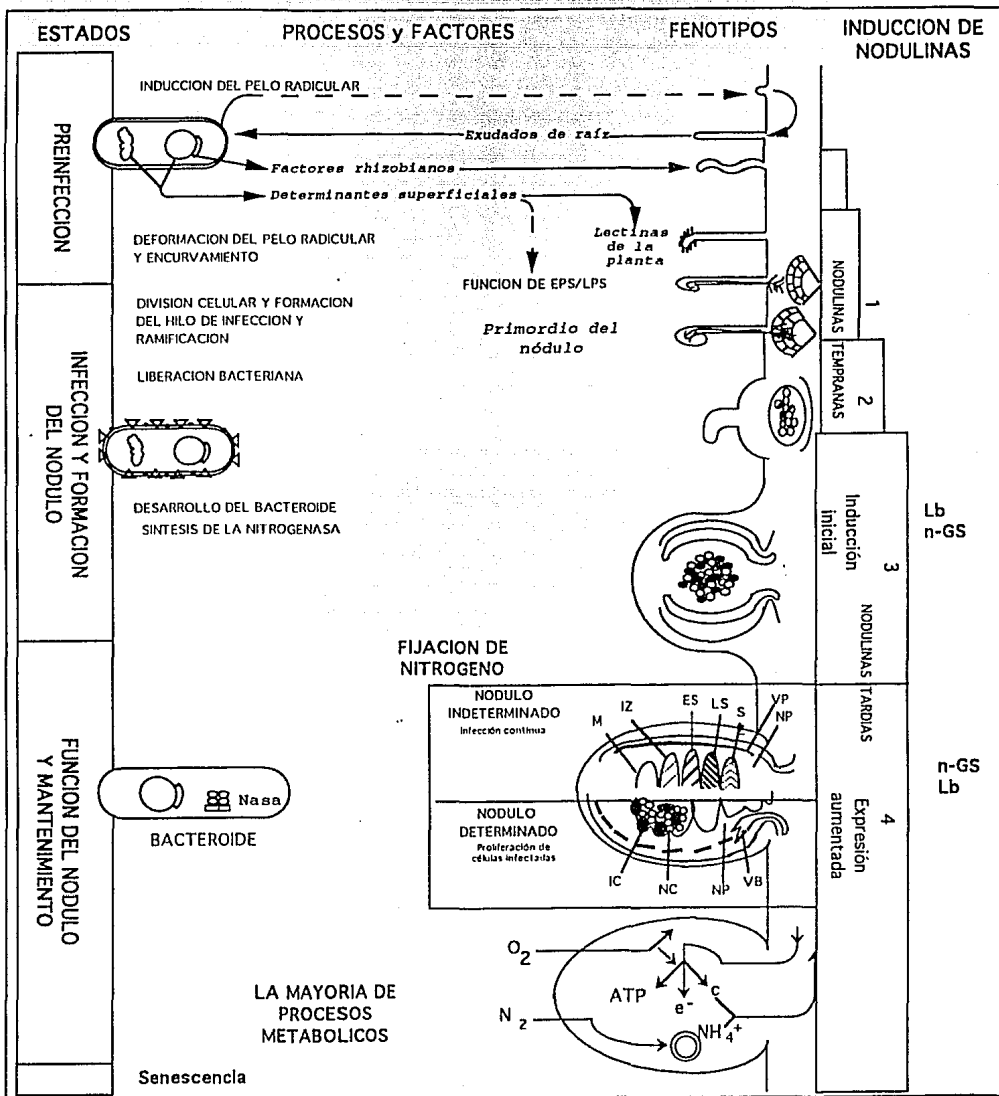


Fig 1. Proceso Simbiótico: 1, 2, 3 y 4 etapas de inducción de las noduleinas. M= meristemo. IZ= zona infectada. ES= simbiosis temprana. LS= simbiosis tardía. SZ= zona de senescencia. VP= haces vasculares. NP= parénquima nodular. IC= células infectadas. NC= células no infectadas. VB= haces vasculares. NP= parénquima nodular. GS= Glutamino sintetasa. GOGAT= Glutamato sintasa. Lb= Leghemoglobina. (Tomado de Sánchez et al., 1991)

emergente más pequeño (Bhuvaneswari et al., 1980). Generalmente, los pelos radicales pierden su capacidad para establecer simbiosis a medida que se diferencian. De acuerdo con lo demostrado para soya (Turgeon y Bauer, 1985), los pelos radicales que serán invadidos aún no han emergido de la raíz en desarrollo al tiempo del primer contacto bacteriano. La presencia de la bacteria causa que el pelo se deforme y se curve en la medida en que se desarrolle (Bauer, 1981). Los pelos radicales llegan a desarrollar una deformación típica en forma de **cayado de pastor** que, en su parte interna, atrapa una bacteria o un grupo de bacterias (Fig. 1).

Inmediatamente abajo del sitio de anclaje de la(s) bacteria(s), el hospedero deposita material propio de la pared celular de tal modo que la planta construye una estructura tubular llamada **hilo de infección** (Fig. 1). Los rhizobia penetran individualmente o en grupos, englobadas por una membrana, a través del tubo mientras éste crece. En el cortex de la raíz, se organiza un meristemo que al dividirse y diferenciarse constituye el tejido nodular. El hilo de infección llega a la base del pelo radical, atraviesa la pared celular y se bifurca varias veces dentro de las células adyacentes recién formadas. Las bacterias se liberan del hilo de infección en el interior de algunas de estas células, pero quedan englobadas dentro de las **membranas peribacteroidales** (Fig. 1). En este momento, las bacterias se transforman en **bacteroides** e inician la fijación del nitrógeno. Concomitantemente la contraparte vegetal sintetiza una serie de proteínas, específicas de la simbiosis, llamadas **nodulinas** (Fig. 1) (Rolfe y Gresshoff, 1988).

Estas nodulinas están involucradas en el desarrollo, estructura, mantenimiento y funcionalidad del nódulo. Se han podido aislar los genes que codifican para algunas de estas proteínas, en diferentes plantas leguminosas, pudiéndose estudiar su expresión durante el desarrollo del nódulo. Una de las nodulinas mejor conocida es la **leghemoglobina**. Esta proteína es la más abundante dentro del nódulo, pudiendo representar entre un 25 y 30% de la proteína total del nódulo. La leghemoglobina es una proteína transportadora de oxígeno, y su función es la de asegurar un flujo suficiente de oxígeno para la respiración del bacteroide, así como de crear un ambiente microaeróbico necesario para una adecuada actividad de la enzima nitrogenasa (Appleby, 1984). Las leghemoglobinas forman parte de las llamadas nodulinas tardías, y su expresión es detectada entre los días 12 y 18 después de iniciado el proceso de nodulación.

El promotor de la leghemoglobina, debido a la gran cantidad de transcrito que dirige es considerado como un promotor órgano-específico fuerte.

### **I.1.2. GENETICA BACTERIANA DE LA FIJACION DEL NITROGENO.**

La nodulación es un proceso compuesto de muchas etapas que ocurren en una secuencia lineal. Cada etapa se puede caracterizar por la acción de un grupo específico de genes, tanto de la bacteria como de la planta, que actúan en concierto bajo la coordinación de señales que se intercambian entre el hospedero y el microsimbionte.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* tienen la información genética para dirigir, en coordinación con la planta, la formación de una estructura altamente especializada: **el nódulo fijador de nitrógeno**. En las especies de *Rhizobium*, la mayoría de los genes para la nodulación y la fijación del nitrógeno están localizados en plásmidos de alto peso molecular llamados **plásmidos simbióticos (pSym)**. Algunos otros genes se localizan en el cromosoma o en otros plásmidos. En las especies de *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* la información genética simbiótica se encuentra en el cromosoma (Martínez et al., 1990).

#### **GENES *Nod***

A grandes rasgos, la secuencia de eventos que ocurren durante la infección, inducción y organogénesis del nódulo, es básicamente la misma para casi todos los rhizobia. Sin embargo, el proceso de nodulación es altamente específico. Si un huésped no infecta al hospedero específico, la nodulación no prospera, lo que apunta a la existencia de dos tipos de funciones: (1) las que definen la especificidad del hospedero y, (2) aquellas que intervienen en las funciones básicas comunes de nodulación. De hecho, se han localizado y aislado dos grupos de genes que, precisamente, modulan estas funciones y, como mencionan Martínez et al. (1990), se encuentran localizados en el plásmido *Sym* (Plásmido simbiótico). Cuando este plásmido se pierde, también se pierde toda la capacidad de interacción con las leguminosas. Si el plásmido simbiótico de una cepa, de un determinado grupo de inoculación, se transfiere a otra de otro grupo de inoculación, la cepa receptora adquiere la propiedad de nodular al hospedero de la cepa donadora, siempre y cuando no haya otro plásmido *Sym*.

Los genes de nodulación en *Rhizobium* spp., están básicamente organizados en dos grupos: los **genes comunes** *nodABCD*, los cuales son esenciales para el encurvamiento del pelo radical y la iniciación de la división celular, y los **genes específicos de nodulación**, requeridos para una correcta inducción del encurvamiento del pelo radical y la apropiada división celular en la leguminosa hospedera.

Los genes *nodABCD* en *Rhizobium meliloti* están organizados en dos operones que se transcriben en dirección opuesta, *nodABC* por un lado y *nodD* por el otro. Las mutaciones en el operón *nodABC* bloquean completamente la respuesta simbiótica y tienen una respuesta muy similar al de las cepas que han perdido su plásmido simbiótico (Downie et al., 1985 y Rosenberg et al., 1981). La capacidad simbiótica se puede restaurar cuando se introducen los genes homólogos de una cepa de otro grupo de complementación, indicando que estos genes son esenciales para la nodulación, y que son intercambiables entre los diversos grupos de complementación, de ahí que se les llame **genes *nod* comunes**.

El gene *nodD*, a diferencia de los otros genes *nod* comunes, puede encontrarse repetido varias veces dentro de un plásmido simbiótico (Rodríguez-Quiñones et al., 1987). Las mutaciones que afectan al gene *nodD* tienen un fenotipo simbiótico que depende de la especie o del grupo de inoculación que las porte. Por ejemplo, las mutaciones en el único gene *nodD*, que tiene *R. leguminosarum* y *R. trifolii*, bloquean desde el inicio la nodulación (Downie et al., 1985). En *R. meliloti*, en donde existen caracterizados cuatro genes *nodD*, los cuales son denominados *nodD1*, *nodD2*, *nodD3* y *syrM*, y donde al menos dos son funcionales, las mutaciones que afectan estos genes causan un severo retraso en la nodulación, sin embargo, el nódulo completa su organogénesis. (Schlaman, et al., 1992).

Dentro de los **genes específicos de nodulación** se encuentran, principalmente, los genes *nodEF*. Las mutaciones que suprimen su acción impiden, por una parte, que la bacteria nodule normalmente a su hospedero usual y, por la otra, hacen que sean capaces de formar cayados de pastor e iniciar, de forma limitada, hilos de infección en otras especies que no sean sus hospederas usuales (Debellé et al., 1986). La función de estos genes no puede restaurarse introduciendo los genes homólogos provenientes de otras especies. La transferencia de *nodEF*,

de una cepa a otra en *Rhizobium meliloti*, causa que la cepa receptora adquiera la capacidad de nodular al hospedero de la cepa donadora (Djordjevic et al., 1987).

En *R. meliloti* se han identificado dos genes más, involucrados en la determinación de la especificidad por el hospedero. A estos genes llamados *nodG* y *nodH*, no se les ha encontrado homólogos en otras especies de *Rhizobium*. Las mutantes en *nodH* no forman hilos de infección ni nódulos en alfalfa, pero pueden inducir nódulos en dos especies de *Vicia* (Horvath et al., 1986).

**Genes *nif* y Genes *fix*.** Los genes para la fijación de nitrógeno en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son, generalmente, divididos en dos grupos: uno de ellos lo conforman todos aquellos genes que tienen homología con alguno de los 17 genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*, como es el caso de los genes *nifK*, *nifD* y *nifH* que codifican para las subunidades de la nitrogenasa y de la nitrogenasa reductasa. En el otro grupo están los genes de fijación del nitrógeno que no tienen homología con los *nif* de *Klebsiella pneumoniae*, e incluye al gene *fixF* y al operón de los genes *fixA*, *fixB*, *fixC* y *fixX* (Aguilar et al., 1985 y Earl et al., 1987). Las mutantes en los genes *nif* y *fix* son capaces de desarrollar nódulos, pero los nódulos no fijan nitrógeno (Nod<sup>+</sup> Fix<sup>-</sup>) (Long, 1989).

En *Rhizobium meliloti*, la regulación de los genes *nif* y *fix* esta mediada por oxígeno. Las bajas concentraciones de oxígeno son detectadas por *FixL*, que es una hemoproteína membranal, que se autofosforila, en bajos niveles de O<sub>2</sub> y puede transferir su grupo fosfato a *fixJ* que, una vez que esta fosforilado, interactúa con la RNA polimerasa para activar la transcripción de *nifA* la cual, a su vez, activará la transcripción de los demás genes *nif* y *fix* (Merrick, 1992)

### **I.1.3. SEÑALES MOLECULARES Y DE RECONOCIMIENTO.**

**Señales simbióticas de la planta.** Las interacciones bacteria-planta empiezan con un señalamiento químico a distancia en la rizósfera. Las sustancias intercambiadas en esta etapa modulan las primeras respuestas y las condiciones para la iniciación de la simbiosis (Fig. 2). En leguminosas, algunos terocarpanos e isoflavonoides pueden funcionar como fitoalexinas, como

moléculas de señal y, probablemente, como reguladores endógenos del transporte polar de auxinas. En exudados y extractos de raíces de leguminosas fueron identificadas algunas flavonas, isoflavonas y flavanonas, como las moléculas inductoras para la quimiotaxis bacterial y para la expresión de los genes *nod* en (*Brady*) *Rhizobium*. Todas estas sustancias son activas a muy bajas concentraciones ( $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ M) y estimulan la expresión de los genes *nod* bacteriales, a los pocos minutos de exposición a estos compuestos. Las sustancias inductoras son exudadas específicamente entre el meristemo radical y la zona de emergencia de los pelos radicales (Hartwig et al., 1990; Peters et al., 1986 y Peters et al., 1990) (Fig. 2).

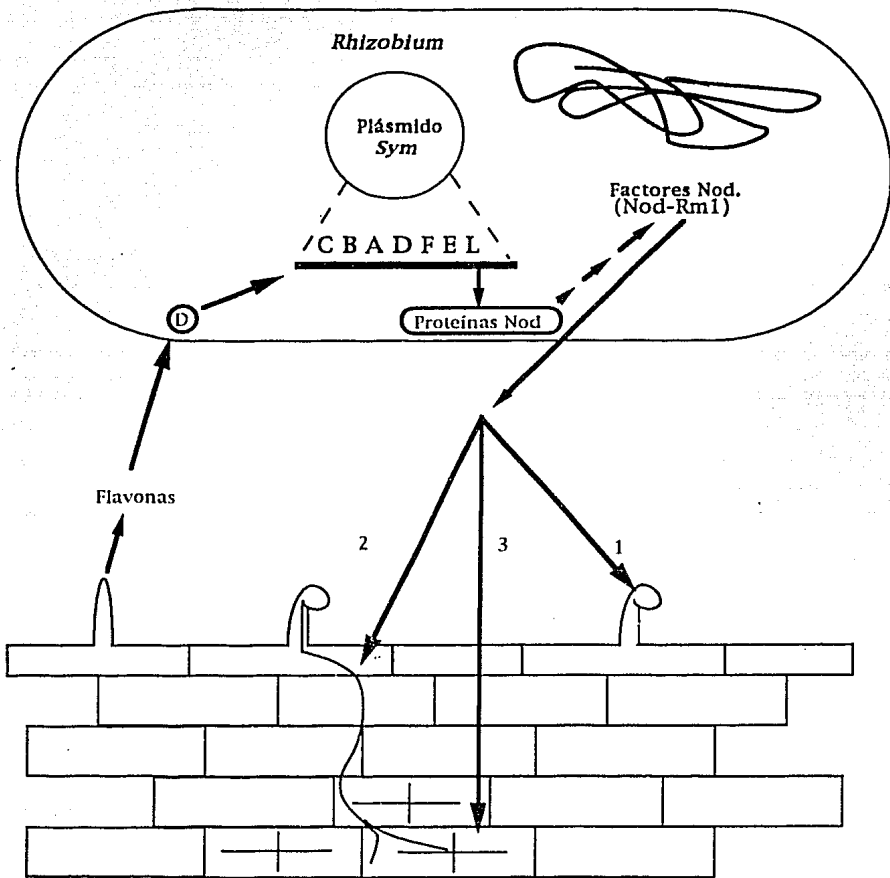
Los primeros eventos de la formación del nódulo en alfalfa requieren de la expresión de los genes de nodulación incluyendo los genes *nodDABC* en el megaplásmido de *R. meliloti* (Fig. 2). La transcripción de *nodDABC* es inducida a través de la acción cooperativa de la proteína NodD, producto del gene *nodD*, exudados de la semilla y de la raíz. La luteolina, (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona) y chrysoeriol, (3'-metoxy-4',5,7 trihidroxiflavona) están presentes en exudados de las semillas de alfalfa y pueden inducir los genes *nod* rhizobiales. Estos compuestos no se encuentran en exudados de la raíz, pero están presentes otros flavonoides inductores de los genes *nod* como el 4,4'-dihidroxi-2-metoxichalcona, 4',7-dihidroxiflavona, y el 4',7-dihidroxiflavanona. Otros flavonoides relacionados a los anteriormente descritos, pueden inducir la transcripción de los genes *nod* en otras especies de *Rhizobia* y *Bradyrhizobia* (Peters et al, 1986 y 1990),(Fig. 2).

**Señales Rhizobiales.** Las señales bacteriales son necesarias para promover las respuestas tempranas de la planta y un desarrollo normal del nódulo. Las etapas iniciales de la interacción entre el rhizobia y su leguminosa hospedera incluyen la deformación y el encurvamiento del pelo radical, la iniciación de la división celular en el córtex de la raíz y la inducción de un meristemo en el nódulo radical. Los genes bacteriales específicos que participan en estos procesos son de 4 tipos: genes *nodD*, genes comunes de nodulación o genes *nodABC*, genes de rango de hospedero y genes involucrados en la producción de polisacáridos (Sánchez et al., 1991).

La habilidad de *Rhizobia* y *Bradyrhizobia* para inducir respuestas celulares en su hospedero, depende de la expresión de ciertos genes de nodulación en la bacteria, como son los genes *nodABC* (Long, 1989). La expresión de estos genes *nod* depende de los compuestos fenólicos exudados por la raíz de la planta hospedera. Esta cadena señales y respuestas ha sido observada en varias simbiosis, en las cuales la expresión de varios genes de nodulación es inducida por compuestos exudados por la superficie de la raíz de la planta hospedera y requiere *nodD* (Mulligan y Long, 1985). Como ya se mencionó anteriormente, estos compuestos fenólicos han sido identificados como **flavonoides** para alfalfa, trébol y chícharo y como **isoflavonoides** para soya (Fig. 2).

La especificidad de la respuesta de la bacteria diferentes flavonoides, está correlacionada con el tipo del gene *nodD* presente en el *Rhizobium*, que puede determinar el rango de hospedero. La proteína NodD posee dos dominios distintos, uno involucrado en la regulación de su síntesis y el otro determina la especificidad al flavonoide (Horvath et al., 1987). El dominio que determina la especificidad no está conservado y difiere entre especies. Un nivel adicional de complejidad en la respuesta de la bacteria a los exudados del hospedero, es la habilidad de los genes *nod* para ser inducidos por compuestos flavonoides de diversos hospederos. Los diferentes niveles en los cuales la especificidad es expresada, sugieren que *Rhizobium* spp. puede sólo inducir sus genes simbióticos cuando las señales adecuadas de la planta son sensadas por los genes *nodD* apropiados. Este proceso probablemente ocurre en regiones específicas de las raíces y en un particular estado de desarrollo de la planta (Van Brussel, 1990).

Se conoce poco acerca de los mecanismos que determinan y controlan la iniciación del nódulo, pero algunas evidencias indican que una señal extracelular relacionada al gene *nod* es requerida para promover una apropiada respuesta del hospedero (Caetano-Anollés, 1988). Un estudio reciente ha demostrado que *NodA* y *NodB* están involucrados en sintetizar factores extracelulares que pueden inducir respuestas en el hospedero, promoviendo la división de las células corticales (Schmidt et al., 1988). El producto del gene *nodA* se encuentra dentro de la célula bacteriana (Schmidt et al., 1986); mientras tanto la proteína NodC está asociada con la membrana celular (John et al., 1988). Evidencias adicionales apoyan la naturaleza extracelular de las señales bacterianas involucradas en la división celular. *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* spp.



**Fig 2.** Interacción entre *Rhizobium* y las raíces de las leguminosas. La planta secreta flavonas, las cuales interactúan con la proteína NodD, la cual a su vez regula la transcripción de los genes *nod* bacteriales. El producto de los genes *nod* bacteriales están involucrados en la síntesis de los **factores Nod (Nod-Rml)**. Los factores Nod son capaces de inducir: **1)** deformación del pelo radical, **2)** algunas etapas del proceso de infección y **3)** división de las células corticales de la raíz.



secretan citocininas (Phillips et al., 1971). La aplicación exógena de la citocinina **benciladenina** indujo pseudoinfecciones en soya (Bauer et al., 1985 in: Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991). Estructuras nodulares vacías fueron también formadas en alfalfa por inhibidores del transporte de auxinas (Hirsch et al., 1989), o cuando *Rhizobium meliloti* fue separado de las raíces usando filtros de membrana (Kapp et al., 1990). Recientemente Lerouge et al. (1990), encontraron una señal simbiótica a la cual llamaron **NodRm-1** [recientemente renombrada como **NodRm-IV (S)**], cuya actividad en alfalfa depende de los genes de rango de hospedero *nodH* y *nodQ* y los genes *nodABC*. La naturaleza química de este factor ha sido determinada. **NodRm-IV(S)** es un tetrasacárido sulfatado  $\beta$ -1-4 D-glucosamina, en el cual tres grupos amino fueron acetilados y uno fue acilado por un ácido graso bis-insaturado. **NodRm-IV(S)**, provoca la deformación del pelo radical a muy bajas concentraciones ( $10^{-11}$ M), y la división de las células corticales hacia la formación de nódulos vacíos a altas concentraciones. Esta señal [**NodRm-IV(S)**] probablemente no es la única requerida para la inducción de las respuestas del hospedero.

Además, se han identificado dos nuevos compuestos en *Rhizobium meliloti* muy parecidos al anterior: **NodRm-V(Ac,S)** y **NodRm-V(S)**, las cuales son muy similares a **NodRm-IV(S)**, pero contienen cinco residuos de glucosamina en lugar de cuatro (Denarié y Roche, 1992).

## II. SISTEMAS DE TRANSFORMACION GENETICA VEGETAL

El desarrollo de la biología molecular y de la ingeniería genética en las plantas, ha permitido la modificación de estos organismos y el conocimiento de la regulación de la expresión de genes específicos que son claves en los procesos metabólicos de las plantas.

El logro más importante ha sido la introducción de genes extraños de forma estable a las plantas, procedimiento denominado como **Transformación Genética Vegetal** y permite la obtención de plantas **transgénicas**, en las que uno o varios genes externos se han integrado a su genoma.

La producción de una planta transgénica requiere que el material genético sea introducido a la célula vegetal y, una vez dentro de ella, el DNA debe atravesar el citoplasma para entrar en el núcleo e integrarse al genoma de la célula, de manera que la nueva característica pueda ser transmitida durante la división celular y consecuentemente, a toda la planta.

La introducción del DNA a la célula vegetal puede lograrse por dos sistemas diferentes: (a) a través de una transferencia física del DNA a la célula y, (b) el uso de un patógeno natural como pueden ser las bacterias del género *Agrobacterium* y los virus.

### II.1. TRANSFERENCIA DIRECTA DE DNA

A través de los años, se han realizado numerosos intentos para la introducción de DNA de forma directa en una variedad de células vegetales, principalmente, debido a la aparente baja susceptibilidad de las monocotiledóneas a la infección por *Agrobacterium*. Las técnicas que hacen factible la introducción de DNA a protoplastos vegetales son conocidas genéricamente como **métodos de transferencia directa de genes**. Estas técnicas permiten tanto la transformación de especies dicotiledóneas como monocotiledóneas y el uso de cualquier vector utilizable en sistemas vegetales. Entre las estrategias desarrolladas para hacer posible la transferencia directa de genes, destacan los tratamientos químicos o eléctricos; microinyecciones intranucleares en protoplastos y fusión de protoplastos con liposomas que encapsulan DNA.

### a) Transformación Química

La transferencia directa de DNA en protoplastos es la técnica más desarrollada para la transformación sin la presencia de vectores. Se trata de un método a través de la co-incubación del DNA con protoplastos en presencia de polietilenglicol (PEG). La condición fisiológica de los protoplastos, así como el estado del ciclo celular en el que se encuentre (Wu, 1989; Brian e Iyer, 1990). Cuando las condiciones de transformación son óptimas, las frecuencias de transformación pueden exceder el 2%, de los protoplastos totales, en protoplastos de tabaco. Las condiciones óptimas, para la transformación, deben ser determinadas dependiendo de la especie vegetal del cual proceda el protoplasto (Brian e Iyer, 1990).

La lista de especies transformadas por este método va en aumento, aunque las frecuencias de transformación están por debajo de las encontradas para tabaco (Potrykus, 1990).

### b) Electroporación

En este método de transformación se usa un campo eléctrico para permeabilizar, de manera reversible, la membrana celular. La membrana celular actúa como un capacitor eléctrico incapaz de pasar corriente, entonces el campo eléctrico provoca que en la membrana celular se formen poros que permiten la entrada de DNA y otras moléculas a la célula vegetal. Al parecer el cerrado posterior de estos poros se da de manera natural (León y Ortíz, 1990). Una de las ventajas de la electroporación es la introducción de DNA que no es necesariamente específico de las especie a la cual se va a transformar (Wu, 1989; Potrykus, 1990).

### c) Microinyección

La microinyección, conceptualmente es el método más directo para la introducción de DNA en células vegetales. La microinyección en protoplastos vegetales se basa en las técnicas de microinyección desarrolladas para células animales. Sin embargo, no se ha obtenido el éxito que se esperaba con la aplicación de este sistema de transformación (Brian e Iyer, 1990). La mayor eficiencia de transformación se obtiene cuando la microinyección es intranuclear, porque la inyección del DNA en el citoplasma provoca una transformación ineficiente. A diferencia de las células animales, en las células vegetales el citoplasma es una barrera significativa para el proceso de transformación de las células vegetales (León y Ortíz, 1990; Brian e Iyer, 1990). Una

de las principales desventajas en el uso de esta técnica es que la inyección puede disminuir la viabilidad de la célula, y solamente se puede aplicar en especies vegetales, para las cuales existan las condiciones adecuadas para su regeneración por medio de cultivo *in vitro* (Wu, 1989).

#### d) Transformación mediada por liposomas

Se ha venido probando en células vegetales un sistema en el cual el DNA es encapsulado en membranas artificiales llamadas **Liposomas** y su transferencia a protoplastos se realiza por un proceso de fusión mediado por polietilenglicol. Las frecuencias de transformación en células vegetales son muy bajas ( $10^{-5}$ ). (Brian e Iyer, 1990).

La mayor limitación en el uso de estos sistemas de transformación genética, ya que se utilizan protoplastos, es el contar con un sistema de regeneración *in vitro* por medio de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para las especies que se desea transformar.

#### e) Biolística

Paralelamente a la introducción de DNA en protoplastos, se han desarrollado metodologías para la transformación de células intactas o tejidos. Uno de los sistemas más significativos es la pistola de microproyectiles o **biolística**, en este sistema el DNA es acarreado al citoplasma a través de la pared celular, en la superficie de una partícula diminuta de metal.

Estas partículas son aceleradas a altas velocidades, lo que las hace capaces de penetrar por varias capas celulares y transformar aquella célula donde queda alojada la partícula. (Arguello-Astorga, et al., 1991).

Al eliminar el paso por el protoplasto, esta técnica se ha venido utilizando con gran frecuencia debido a su gran potencialidad. Actualmente, se está tratando con esta metodología la transformación directa, tanto de polen como del órgano reproductor femenino, lo cual obviaría cualquier problema de regeneración (Potrykus, 1990).

## II.2. TRANSFORMACION MEDIADA POR *AGROBACTERIUM*.

Aunque en los últimos años se ha incrementado el número de técnicas específicas para la transformación genética vegetal, el método mas eficiente, fácil y de gran versatilidad para la introducción de DNA a las plantas ha sido el que usa el sistema de *Agrobacterium* (Tempe y Schell, 1988). *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* son bacterias patógenas que habitan en el suelo, y son los agentes etiológicos de las enfermedades conocidas como "crown gall" (agalla del cuello) y "hairy roots" (raíces peludas), respectivamente. La respuesta patogénica es el resultado de la expresión de ciertos genes transferidos de la bacteria hacia el genoma de la planta. (Tempe y Schell, 1988; Gasser y Fraley, 1989).

La capacidad de transformación de las células vegetales se debe a la presencia en *Agrobacterium* de los plásmidos **Ti** (inductor de tumores) y **Ri** (inductor de raíces). Dos regiones dentro de los plásmidos, **Ti** y **Ri**, son esenciales para la transferencia del DNA (T-DNA), estas son el **T-DNA**, y la **región de virulencia (vir)**.

El T-DNA esta delimitado, en ambos extremos, por 25 pares de bases repetidas de forma directa a los que se les denomina **bordes**. Estas secuencias son requeridas para la transferencia del T-DNA, y son las secuencias de reconocimiento de una endonucleasa específica, codificada por el operón *virD* (Klee et al. 1987). La región de virulencia o *vir* contiene los genes necesarios para la transferencia del DNA, pero estos no son transferidos a la planta.

La región *vir* es de aproximadamente 40 Kb e incluye ocho operones llamados *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH* (Hooykas y Schilperoort, 1992). Los plásmidos de **Ti** y **Ri** de varias cepas de *Agrobacterium* han sido bien caracterizados, y los resultados indican que los plásmidos comparten una arquitectura básica (White, 1989).

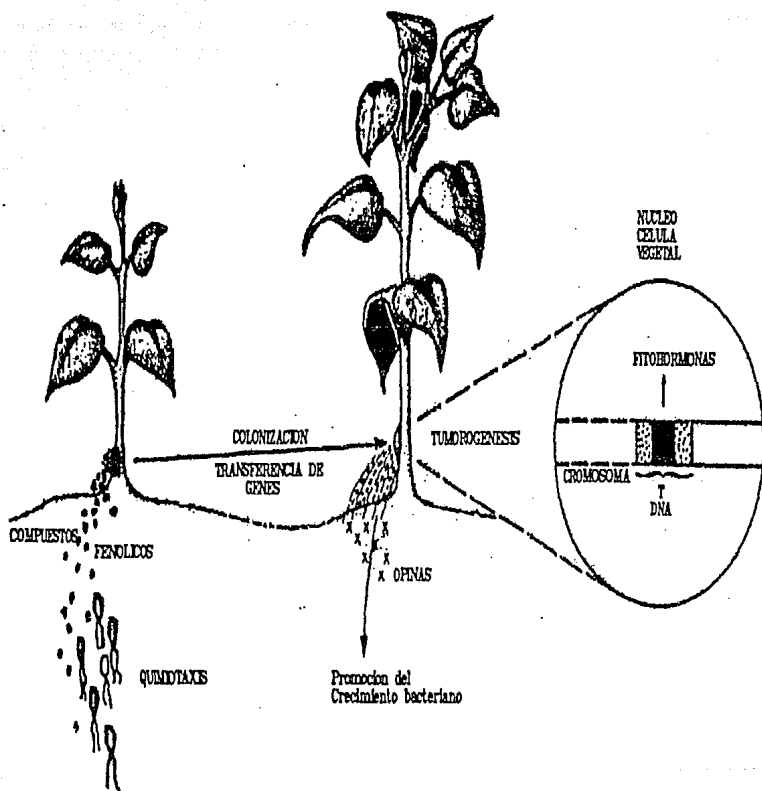
Un tercer componente son los genes cromosomales de virulencia (**chv**), localizados en el cromosoma bacteriano. Los genes *chv* estan involucrados en la adhesión del *Agrobacterium* a las células vegetales (Citovsky et al., 1992). Los genes *chvA* y *chvB* son necesarios para la adhesión de la bacteria a la pared celular de las plantas. Se sabe que *chvB* codifica para una proteína de 235 kDa involucrada en la formación de  $\beta$ -1,2 glucano, mientras que hay evidencias de que *chvA* codifica para una proteína transportadora, localizada en la membrana interna de la bacteria, necesaria para el transporte del  $\beta$ -1,2 glucano al periplasma. Mutantes en estos genes resultan ser

avirulentas, lo cual sugiere que resulta en alteraciones químicas de la superficie de la bacteria que le imposibilitan adherirse a la célula vegetal.(Binns y Thomashow, 1988).

La transformación por medio de *Agrobacterium* involucra una serie de eventos con una secuencia temporal: colonización de la bacteria y adhesión a los sitios donde se presenta una lesión en la planta; respuesta de la planta lesionada, movilización del DNA bacterial a la planta; integración del T-DNA al genoma vegetal y por último, su expresión.(Binns y Thomashow, 1988).(Fig.3)

Una de las primeras etapas de la transferencia del DNA esta dada por la activación coordinada de los genes *vir* cuando la bacteria esta cercana a una zona donde la planta ha sufrido una lesión y puede detectar exudados de la planta. Mientras que los genes *chv* estan siendo expresados de manera constitutiva, los genes *vir* necesitan ser inducidos por la presencia de factores exudados por la planta (Fig. 3). (Zambryski et al., 1983). Los factores han sido identificados como compuestos fenólicos principalmente acetosiringona y Ó-hidroxiacetosiringona. Estos compuestos son excretados por la planta particularmente cuando se le ha causado una herida o lesión, y se ha visto que son un factor previo para la infección por *Agrobacterium*. Las plantas pueden excretar diferentes compuestos fenólicos capaces de inducir genes *vir*, sin embargo la acetosiringona parece estar, de manera general, en la mayoría de las plantas susceptibles de ser infectadas por *Agrobacterium*. De la misma forma las plantas pueden producir compuestos que son inhibidores de la inducción de genes *vir* (Sahi et al., 1990).

Los mecanismos básicos de regulacion que controlan la expresión de los genes *vir* fueron establecida por Stachel, Nester y Zambryski (1986), ellos demostraron que la inducción de los genes *vir*, por inductores vegetales, esta mediada por la acción de los productos de los genes *virA* y *virG*. Mutaciones en *virG* eliminaron por completo la inducción de *virB*, *virC*, *virD* y *virE*. Por otra parte, mutaciones en *virA* atenúan de manera severa la inducción de los otros genes *vir*. Ambos genes son expresados de manera constitutiva, pero en presencia de los inductores vegetales el nivel de expresión aumenta de manera significativa, siendo mas evidente en el producto de *virG* con respecto a *virA* (Binns y Thomashow, 1988; Citovsky et al.,1992).



**FIGURA 3. Secuencia de las etapas que ocurren durante la transformación genética de plantas susceptibles a Agrobacterium.**

Se ha propuesto que *virA* funciona como un sensor o transportador de señales moleculares que activan *virG*, el cual es un regulador positivo de los genes *vir*. El análisis de secuencias ha mostrado que el sistema *virA/virG* pertenece a una familia de sistemas de regulación positiva de dos componentes similares a los sistemas NtrB-NtrC (*Klebsiella pneumoniae*); EnvZ-OmpR (*E. coli*) y SpoOA-SpoOB (*Bacillus subtilis*). Todos estos sistemas regulatorios, tienen además en común la característica de actuar en respuesta a estímulos ambientales e inducir la expresión de genes que le son necesarios para ajustarse o tomar ventaja del estímulo ambiental. El componente que funciona como sensor, normalmente una proteína en membrana, responde al estímulo ambiental fosforilándose, y tiene la capacidad de transferir el fosfato al componente regulatorio. El componente regulatorio entonces funciona como un activador transcripcional para regular los genes para la respuesta de la célula al estímulo externo. (Binns y Thomashow, 1988; Citovsky et al., 1992). (Fig.4)

Una serie de evidencias han demostrado que el T-DNA es cortado del plásmido Ti posterior a la inducción de la región *vir*. Este proceso involucra la acción de los productos de los genes *vir* y los bordes que delimitan la región de T-DNA, tanto en plásmidos Ti como en Ri (Hooiykas y Schilperoort, 1992). En varios laboratorios se ha demostrado la formación de una hebra lineal y sencilla de DNA llamada "T-strand" (hebra-T) la cual corresponde a la hebra inferior de la cadena doble del T-DNA. La formación de la hebra-T depende de la acción de dos proteínas llamadas *VirD1* y *VirD2* que son codificadas por el operón *virD*. Estas proteínas de manera conjunta adquieren una actividad de endonucleasa capaz de cortar el DNA en un sitio preciso de los bordes. Los "nicks" han sido mapeados entre las pares de bases tres y cuatro de la hebra inferior de los 25 pares de bases que constituyen el borde. (Citovsky et al., 1992) (Fig.5)

Una vez formada la hebra, la proteína *VirD2* permanece adherida a ésta, al parecer por una unión covalente. Esto puede representar una función extra de la proteína *VirD2*, ya que pudiera actuar como una proteína piloto para dirigir la hebra de DNA a través de varias membranas durante su transferencia del *Agrobacterium* hacia la planta, además de darle protección contra otras endonucleasas (Fig. 5).

Al parecer la función de protección de la hebra-T la realiza el producto codificado por el gene *virE2*, el cual se ha encontrado preferentemente ligado a la hebra sencilla de DNA. El



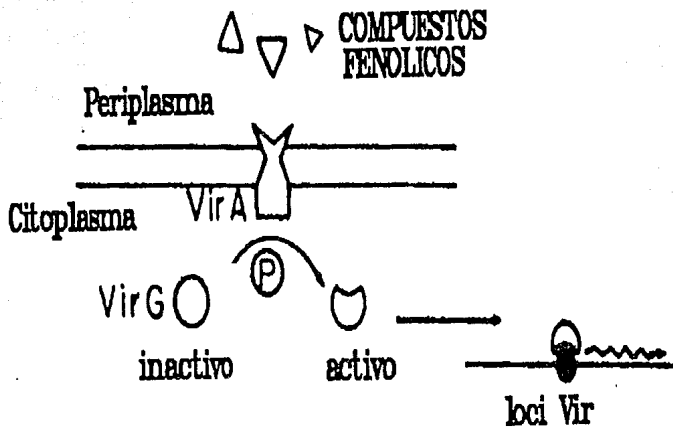


FIGURA 4. Diagrama del sistema de regulación de los genes *VirA/VirG*

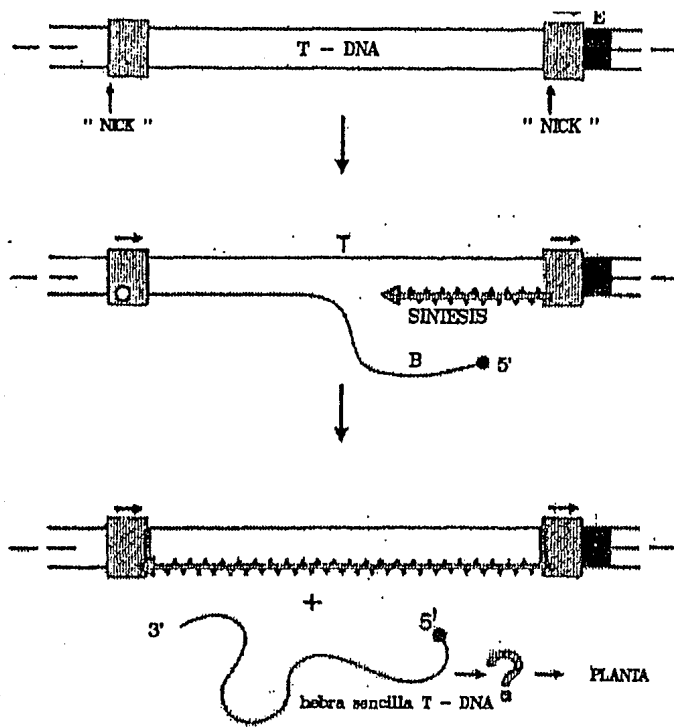


FIGURA 5. Modelo para la formación de la hebra-T en Agrobacterium tumefaciens. El círculo negro en la región 5' final de la hebra-T representa a la proteína del gen VirD2 unida al DNA por un enlace covalente.

pegado de la proteína *VirE2* es un proceso rápido que permite de manera inmediata la formación de un complejo proteína-DNA el cual es muy estable.(Citovsky et al., 1992). Una vez que el complejo *VirE2*-hebra-T ha sido formado, este permanece estable y esta potencialmente listo para ser transferido. Una vez formado el nuevo complejo proteína-DNA, éste debe ser exportado del *Agrobacterium* a la célula receptora. Al parecer, la exportación del complejo-T se produce por canales especializados en la membrana bacterial. Los candidatos para la producción de tales canales son los productos del operón *virB*, la mayoría de los cuales son proteínas transmembranales o asociadas a membrana. El operon *virB* contiene 11 genes, llamados *virB1*...*virB11*. Todos los *virB* ORFs tienen secuencia de aminoácidos de suficiente hidrofobicidad, que permite la interacción con una membrana de doble capa lipídica.

Una vez exportado el T-DNA, el proceso de integración a la planta es el aspecto menos entendido de la transformación mediada por *Agrobacterium*. No han sido identificados intermediarios del T-DNA en las plantas receptoras y no se conoce de sitios específicos o el mecanismo de integración (Binns y Thomashow, 1988).(Fig. 6)

El sitio primario de integración del T-DNA es el genoma nuclear de la célula vegetal, aunque existe un reporte de T-DNA integrado al DNA del cloroplasto (De Block et al., 1985). Sin embargo, se ha observado que la inserción se puede dar en cualquier parte del genoma y que pueden presentarse varias inserciones en una misma célula vegetal. No se ha observado que se requiera una secuencia nucleotídica específica. No obstante, los sitios de unión del genoma de la planta con el inserto de T-DNA son ricos en AT. Gheysen et al., (1987), sugieren que esta característica puede producir una desestabilización local de la doble cadena de DNA de la planta y, de esta forma, facilitar el proceso de integración. Ya realizada la integración del T-DNA se mantiene de manera estable en la planta receptora por el proceso de meiosis y presenta un comportamiento mendeliano con respecto a la transmisión de los genes insertados.(Tempé y Schell, 1988; David y Tempé, 1987).

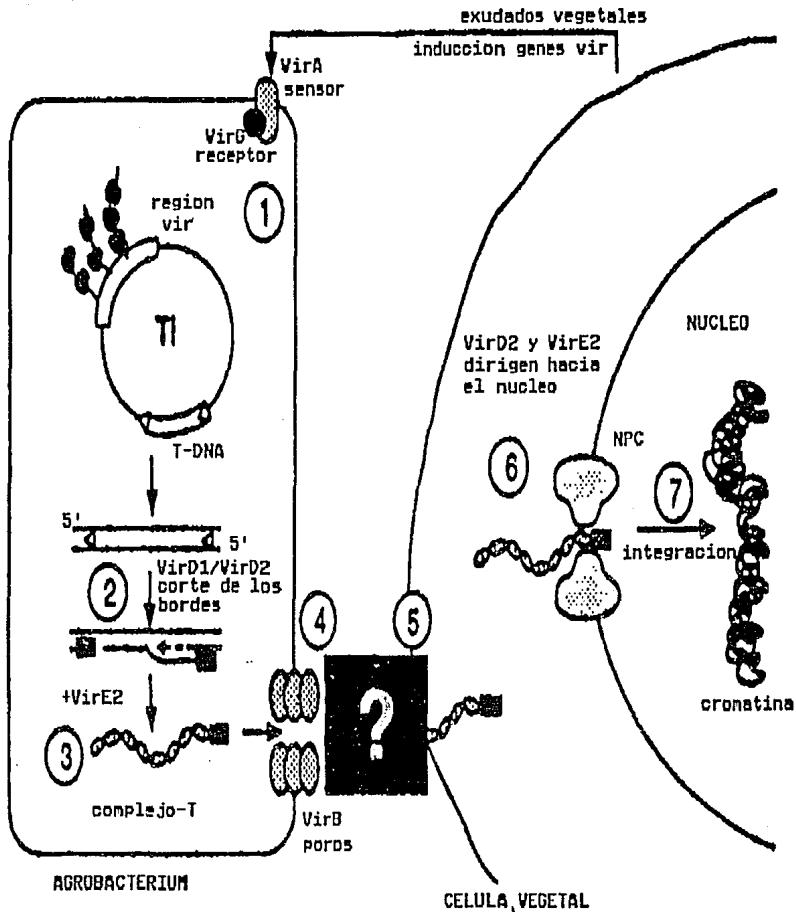


FIGURA 6. DIAGRAMA DEL PROCESO MOLECULAR DE TRANSFERENCIA DEL T-DNA POR Agrobacterium tumefaciens. LOS NUMEROS INDICAN EL ORDEN PROGRESIVO DE LOS EVENTOS.

## II.2.1. VECTORES PARA TRANSFORMACION.

Aunque se sabía que el T-DNA es la única parte del plásmido Ti que se integra en el genoma de la planta, permanecía la duda si solamente el T-DNA entraba a la planta o entraba por completo el plásmido Ti via *Agrobacterium*. En experimentos realizados por De Framond et al. y Hoekema et al. (1983), donde la región T fue separada del resto del plásmido, ellos demostraron que éstas dos partes se mantuvieron en replicones independientes y que no volvieron a cointegrarse. Esto permitió establecer, de manera firme, que no era necesaria una unión física entre el T-DNA y el resto del plásmido Ti para que se llevara a efecto la transferencia del T-DNA.

Como ya se mencionó el sistema de transferencia del T-DNA esta controlado por los genes *vir* y *chv*, mientras que los bordes, los cuales delimitan la región T son esenciales para el reconocimiento de las señales del aparato de transferencia. Con base en estos resultados, ha sido posible la construcción de vectores para la transformación genética de plantas. (White, 1989).

Los vectores para transformación de plantas, basados en el sistema de *Agrobacterium*, se han dividido en dos categorías: aquellos que se integran al plásmido Ti nativo, llamados **Cointegrados**; y aquellos que se replican autónomamente llamados **Binarios** (Klee et al., 1985). Los vectores para transformación cointegrados, deben de contener una región de homología entre el material genético a insertar y el plásmido Ti. Este requerimiento de homología hace que el vector sólo sea capaz de integrarse en un limitado número de plasmidos Ti. Estos vectores están diseñados para integrarse en plásmidos Ti específicos. Actualmente se usan dos sistemas de plásmidos cointegrados. El primero es el que usa el plásmido Ti, desarmado, de *Agrobacterium* el pGV3850. En este plásmido los genes para la síntesis de fitohormonas del plásmido C58 han sido removidos y reemplazados por una secuencia de pBR322. Así, cualquier material genético que presente homología con la secuencia del pBR322, podrá integrarse al plásmido Ti desarmado (Klee et al., 1985). La cointegración coloca al nuevo DNA entre los bordes de plásmido Ti, situación requerida para su transferencia.

En el otro sistema, el borde derecho y la región que codifica para las fitohormonas son removidos del plásmido Ti. El borde izquierdo y una pequeña parte del T-DNA original, que se le llama Homología Interna Limitada(LIH), permanecen intactos. El vector al ser introducido en

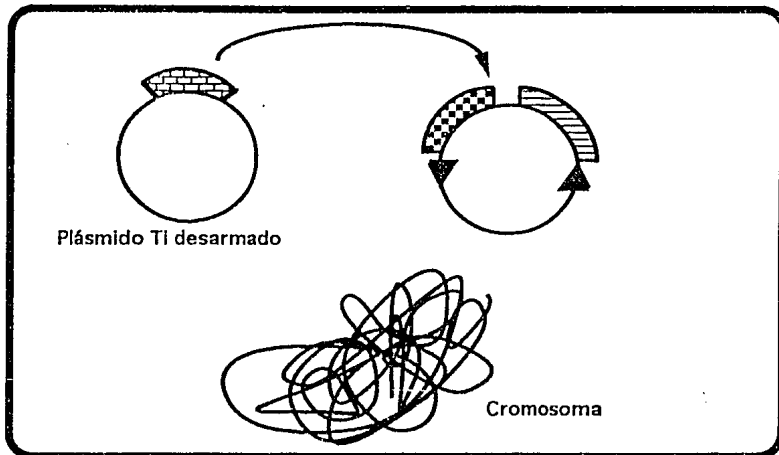
el *Agrobacterium*, que contiene la región LIH, para una recombinación homóloga así como un borde derecho (Klee et al., 1985; White, 1989). El DNA cointegrado reconstruye un T-DNA funcional con un borde derecho y un borde izquierdo. Este sistema se ha usado ampliamente para la introducción de varios genes en plantas.





Los vectores cointegrados, una vez formados, son muy estables en *Agrobacterium*, y es casi imposible que se pierdan. Esta es una ventaja sobre los vectores binarios donde la estabilidad del plásmido requiere la presencia del agente de selección.

Los sistemas binarios de transformación consisten de dos elementos separados: el primero es un vector capaz de replicarse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*, que lleva el material genético a transferir entre los bordes de la región T-DNA; y el otro elemento es un plásmido Ti desarmado, el cual provee las funciones de la región *vir* que son necesarias para la transferencia del T-DNA. (Gheysen y Depicker, 1987). La mayor ventaja de los sistemas binarios es que no son tan específicos o dependientes de un plásmido Ti, y pueden ser introducidos casi en cualquier *Agrobacterium* que contenga tanto un plásmido Ti como uno Ri. Esto es importante en la transformación de plantas, porque las especies vegetales presentan diferente susceptibilidad a la infección por *Agrobacterium* (Gheysen y Depicker, 1987; Klee et al., 1985). (Fig. 7)

Para que un gene bacteriano se exprese en una célula de plantas, requiere tener secuencias regulatorias específicas que permitan su expresión en las células eucarióticas. Se requieren secuencias reguladoras, tanto en el extremo 5' como en el extremo 3', del gene. Es indispensable fusionar al gene bacteriano, un promotor de plantas (en el extremo 5') y, en la región 3', se requiere fusionar una secuencia terminadora y de poliadenilación para genes eucariotes. (Schell, 1987). Los genes que resultan de estas fusiones se llaman genes quiméricos, debido a que contienen secuencias provenientes de distintos genes y de distintos organismos. (Gheysen y Depicker, 1987; Schell, 1987).

En la construcción de estos genes quiméricos, se pueden utilizar dos tipos de promotores principalmente, los constitutivos y los específicos. Los constitutivos son promotores que se expresan en todas las células de la planta; uno de los más usados, por ser un promotor fuerte, es el 35S de CaMV (virus del mosaico de la coliflor) ((Schell, 1987). Los otros son los llamados



-  Región *Vir*.
-  Genes marcadores.
-  Genes de interés.
-  Bordes.

**FIG. 7. SISTEMAS BINARIOS PARA LA TRANSFORMACION GENETICA DE PLANTAS MEDIADA POR *Agrobacterium*.**

promotores específicos cuya expresión es regulada en la célula vegetal en respuesta a un estímulo como la luz, puede expresarse en un período, específico, del desarrollo de la célula o puede ser específico de cierto tejido de la planta y así, regular la expresión del gene al que se fusione. Un ejemplo de estos últimos es el promotor de la leghemoglobina que se expresa solamente en el nódulo y durante la nodulación de las plantas leguminosas, por lo que puede permitir análisis más finos sobre la expresión de un gene nódulo específico (Benfey y Chua, 1989; Stougaard et al., 1987).

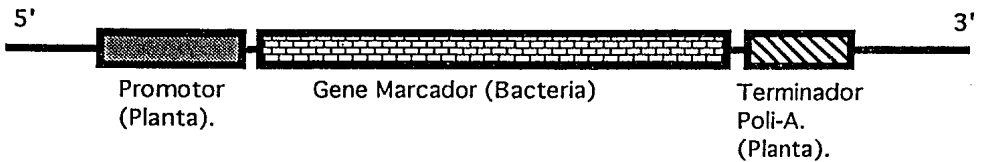
En la actualidad, se usan, muy frecuentemente, como marcadores en sistemas de transformación genética los genes selectivos y/o genes reporteros o rastreables. Estos genes se pueden identificar en las células de las plantas de manera fácil y rápida. Los genes o marcadores selectivos son, por ejemplo, aquellos que confieren resistencia a los antibióticos como: Kanamicina (Km) o Higromicina (Hy), u otras sustancias tóxicas, a las cuales son sensibles las plantas no transformadas.

Se cuenta en la actualidad, con una serie de genes aislados y que son accesibles para usarlos como genes de selección (Schell, 1987). Los genes reporteros o rastreables, usados en la transformación genética de plantas, son aquellos que codifican para enzimas cuya actividad es fácilmente detectable con un ensayo enzimático muy sensible. Los genes reporteros más comúnmente usados son; el de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), el de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y el de luciferasa (Jefferson, 1987). (Fig 8)

### **II.2.2. Metodología general de transformación mediada por *Agrobacterium*.**

El método de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* consiste, básicamente, en cultivar juntos los tejidos vegetales y la cepa no oncogénica de la bacteria, en las que se ha introducido el DNA que se desea transferir a las plantas. Se cortan pequeños segmentos de tejido vegetal y se les hacen heridas, estos cortes son sumergidos en una suspensión de las células bacterianas, por períodos de tiempo que varían de acuerdo al vegetal a transformar. Transcurrido el tiempo seleccionado, los tejidos vegetales son secados con papel filtro estéril y son sembrados en una caja con medio de cultivo sin adicionar antibiótico (**co-cultivo**), por períodos de 24 a 48 horas. Posteriormente se pasan a un medio con presencia de antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano. Por último, se regeneran nuevos individuos a partir de los tejidos infectados por





Ejemplos:

Promotor (Planta).	Gene Marcador (Bacteria)		Terminador Poli-A. (Planta).
	Selectivo	Reportero	
CaMV35S	npt II-Km <sup>r</sup>	GUS	NOS
NOS	aph-IV-Hy <sup>r</sup>	LUX	T-7
rbc-S		CAT	rbc-S

**FIG. 8. Elementos usados en la construcción de genes quiméricos para la transformación genética de plantas.**

medio de **organogénesis** o **embriogénesis somática**. El método puede sufrir variaciones en cuanto al tipo de tejido vegetal, concentración de la suspensión bacteriana y tiempo de co-cultivo. Los tejidos susceptibles de ser transformados abarcan, virtualmente, a todos los de la planta; cotiledones, tubérculos, hoja y raíz. La elección del tejido esta principalmente determinada por su capacidad de regeneración *in vitro* (Arguello-Astorga et al., 1991).

Un sistema de transformación alternativo, y muy similar al de *Agrobacterium tumefaciens* que, también, esta siendo ampliamente utilizado es el de *Agrobacterium rhizogenes*. Este es una bacteria patógena de plantas dicotiledóneas que causa la enfermedad de "**hairy root**" ("raíz peluda"), la cual se caracteriza por la proliferación de raíces adventicias en el sitio de infección bacterial. La capacidad rizogénica es transmitida a la planta, debido a la transferencia de una porción de DNA de un gran plásmido bacteriano llamado Ri (root inducing, inductor de raíz), que se hospeda en la bacteria y se integra al genoma de la planta. (Beach y Gresshoff, 1988; Hansen et al., 1989; Simpson et al., 1986; Spano et al., 1987; y Tepfer, 1984). El DNA transferido al genoma de la planta es responsable tanto de la biosíntesis de auxinas así como de metabolitos derivados de aminoácidos llamados opinas. Cuando un DNA extraño, es introducido en la región T-DNA, éste puede ser llevado via plásmido Ri al interior de la célula de la planta hospedera, haciéndolo un vector natural para la introducción rápida de genes a las plantas superiores. También, en este organismo se pueden utilizar vectores cointegrados y sistemas binarios, lo cual permite la introducción de genes quiméricos. Se han obtenido, recientemente, plantas transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, donde el material genético extraño se ha integrado, de manera estable en zanahoria, tabaco, papa y *Convolvulus saepium*. (Tepfer, 1989).

### **II.3. Transformación genética de plantas leguminosas.**

En general, es difícil obtener plantas transgénicas de la familia de las leguminosas, aunque esta familia de dicotiledóneas es sensible a la infección por *Agrobacterium*. En muchos casos, aún no se ha podido obtener plantas transformadas de leguminosas porque no se han establecido los métodos para regenerar estas plantas, a partir de diferentes inóculos, los cuales pueden ser usados para la transformación mediada por *Agrobacterium*. De hecho, uno de los principales obstáculos en el estudio de la genética molecular de la fijación simbiótica del

nitrógeno es la carencia parcial de un sistema adecuado de transformación y regeneración de leguminosas (Hansen et al., 1989).

Se ha logrado la transformación genética de alfalfa mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. También se han obtenido plantas transgénicas de variedades de *Medicago varia* con un gene de resistencia a kanamicina fusionado al promotor de la nopalino-sintetasa (Deak, et al., 1986). Utilizando una línea altamente embriogénica de *Medicago varia* se aumentó el porcentaje de transformación (Chabaud et al., 1988). Así mismo hay un informe sobre la transformación y regeneración de *Medicago sativa* (Shahin et al., 1986). En alfalfa, los sistemas de transformación son poco eficientes, además se requiere mucho tiempo para la obtención de plantas regeneradas que pudieran permitir el estudio de la expresión nódulo específica.

Así mismo, se ha realizado con éxito la transformación de algunas leguminosas por medio de *A. rhizogenes*, entre la que está *Lotus corniculatus* (Petit et al., 1987; Hansen et al., 1989), *Medicago sativa* (Spano et al., 1986) y *Pisum sativa* (Beach y Gresshoff, 1988).

Los sistemas de transformación con *A. rhizogenes* pueden emplear cepas virulentas, porque las raíces peludas tienden a regenerar brotes de manera espontánea, a diferencia de lo que ocurre con *A. tumefaciens* donde es prácticamente imposible recuperar plantas, a partir de tejido tumoral (Arguello-Astorga et al., 1991). Otro aspecto interesante de este sistema de transformación es que, en algunos casos, las "hairy root" obtenidas pueden ser noduladas por la especie de **Rhizobium** correspondiente a cada especie de leguminosa. Lo anterior permitiría establecer sistemas de transformación para lograr un mejor conocimiento de los eventos moleculares de la fijación simbiótica del nitrógeno.

## OBJETIVOS

La carencia de un sistema de transformación y regeneración, eficiente y rápido, en ciertas leguminosas, de interés, limita el conocimiento de los procesos moleculares de la planta con respecto a la fijación simbiótica del nitrógeno, así como la posibilidad de optimización de este proceso natural por medio de la manipulación de la expresión de genes en el nódulo, que permita adicionar información genética, que ayude a hacer más eficiente todo el proceso de la fijación de nitrógeno.

Este proyecto pretende utilizar el sistema de *Agrobacterium rhizogenes* para transformar dos especies de plantas leguminosas: *Lotus corniculatus* y alfalfa (*Medicago sativa*). Por una parte, *Lotus corniculatus* es una de las primeras especies de leguminosas en la cuales se realizó, con éxito, la transformación genética de la misma, mediado por *Agrobacterium rhizogenes*, y presenta una gran capacidad de regeneración, ya que se obtuvieron plantas completas de las raíces transformadas de manera casi espontánea y la nodulación de estas, con *Rhizobium loti*, se realizó con gran facilidad (Beach y Gresshoff, 1987; Hansen et al., 1989; Petit et al., 1987). Por tanto estableceremos este sistema en el laboratorio para tomarlo como modelo para transformación de otras leguminosas. La alfalfa, que es la principal especie forrajera del país, presenta un genoma que es tetraploide y heterógamo. *M. sativa* es nodulada por *Rhizobium meliloti*, que es la especie de *Rhizobium* de crecimiento rápido mejor estudiada desde el punto de vista genético y molecular.

Se propone utilizar el método de generación de raíces transgénicas, "hairy roots", propagadas *in vitro* y nodularlas con el *Rhizobium* específico de cada planta, como un sistema para estudiar la regulación de la expresión genética en nódulo. Además, se buscará regenerar plantas transgénicas de *Lotus* a partir de las "hairy roots" transformados y así poder estudiar la expresión genética en diferentes tejidos de la planta durante la simbiosis con *Rhizobium loti*. Se establecieron sistemas de transformación usando los dos tipos de vectores descritos, vectores cointegrados y sistemas binarios. Se usará un vector cointegrado derivado de un plásmido Ri al cual se le integró un gene de  $\beta$ -glucuronidasa, (GUS), que se usará como detector con un promotor constitutivo. En el sistema binario, se usará como detector el gene de GUS fusionado al promotor constitutivo 35S CaMV. Además, se construirán y se usará un plásmido con fusión

de GUS con un promotor nódulo-específico como el de la Leghemoglobina de soya (Stougaard, et al., 1987). Esto último nos permitirá demostrar que los sistemas de transformación genética establecidos pueden ser útiles, para el estudio de la regulación específica de la expresión genética durante la nodulación de plantas leguminosas con *Rhizobium sp.*

## I.OBJETIVOS GENERALES

1. Utilizar el sistema *Agrobacterium rhizogenes* para la obtención de raíces transgénicas noduladas de *Lotus corniculatus* y *Medicago sativa*. 2. Regenerar plantas completas, in vitro, a partir de las raíces transformadas por medio de *Agrobacterium rhizogenes*, tanto de *Lotus corniculatus* como de *Medicago sativa*.

## II. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Construir un plásmido capaz de replicarse en *Agrobacterium rhizogenes*, que contenga, además del gene de resistencia a Kanamicina, el gene de GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) fusionado a un promotor específico de nódulo el de Leghemoglobina de soya. (Stougaard et al., 1987)
- 2.- Construir las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* requeridas para el proceso de transformación genética.
- 3.- Establecer el sistema de transformación genética, para *Lotus corniculatus* mediado por *Agrobacterium rhizogenes*.(Hansen et al., 1987)
- 4.- Determinar la capacidad de nodulación de diferentes variedades de alfalfa, para transformar aquella o aquellas con una mayor capacidad simbiótica.
- 5.- Establecer un sistema de transformación genética para *Medicago sativa* mediado por *Agrobacterium rhizogenes*.
- 6.- Nodular las "hairy roots" obtenidas, raíces transgénicas, con *Rhizobium loti* para *Lotus corniculatus*, y con *Rhizobium meliloti* para *Medicago sativa*.
- 7.-Evaluar la frecuencia de transformación obtenida, utilizando un vector cointegrado vs. un sistema binario. Esto último se hará en ausencia de la Km como agente selectivo, determinando

la actividad de GUS para evaluar la eficiencia de transformación.

8.- Implementar un sistema para regenerar plantas de *Lotus corniculatus* a partir de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*.(Petit et al., 1987)

9.- Comparar la actividad de GUS en nódulo y otros tejidos cuando la expresión de este gene esta dirigido por un promotor constitutivo vs, un promotor específico de nódulo. En todos los sistemas de transformación mencionados, en ambas especies.

# MATERIALES Y METODOS

## I. MATERIAL BIOLÓGICO

### I.1. Material Vegetal

Para la obtención de plántulas sometidas al proceso de transformación, se utilizaron semillas de *Lotus corniculatus*, variedad "Rodeo" (proporcionadas por F. de Brujin).

*L. corniculatus* es una leguminosa perene, heterógama y tetraplóide que es utilizada como forraje en los Estados Unidos y parte de Canadá, y se cultiva extensivamente. El valor alimenticio de la paja de *Lotus* es comparable con el de alfalfa (Tabaezadeh, 1989). Además, se utilizaron semillas de alfalfa (*Medicago sativa*), de nueve variedades: Valenciana, Inia 76, Puebla 76, Bajío 76, SintéticoI, SintéticoII, San Joaquín, Velluda Peruana y Moapa 69, proporcionadas por el Ing. Luis Castro Acero, Investigador del Programa de Forrajes del CIFAP México, INIA-SARH.

### I.2. Cepas Bacterianas

Se utilizaron dos cepas de *Agrobacterium rhizogenes*. La cepa C58CI/pRi12 (Rif Km<sup>r</sup>)/pRi12(5'35S-GUS-3'NOS) y la cepa C58C1/pRi15834 (silvestre), usada como receptora de los genes quiméricos para vectores binarios, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Mario Rocha del Instituto de Biotecnología de La UNAM.

Las fusiones génicas de los promotores CaMV 35S y Lbc, con la región codificadora del gene de  $\beta$ -Glucuronidasa, contenidos en derivados del pBIN19 fueron transferidos de *E. coli* CMK a la cepa de *A. rhizogenes*, por medio de una conjugación triparental (Ditta et al., 1980), usando como ayudante una cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido pRK2013. Las células transconjugantes fueron seleccionadas en un medio de LA con rifampicina (50  $\mu$ g/ml) y kanamicina (50  $\mu$ g/ml). La presencia de los genes quiméricos fue comprobada con restricción del DNA de plásmido, antes de realizar la transformación de las plantas.

Para los ensayos de nodulación o efectividad simbiótica, se utilizaron las cepas de *Rhizobium loti* NZP2037, en el caso de *Lotus corniculatus* y de *R. meliloti* 2011, que tiene resistencia a estreptomycin (Meade et al., 1982), para la nodulación de alfalfa.

### I.3. Plásmidos

Entre los plásmidos utilizados para la transformación genética vegetal está el **pRi12** (Hansen et al., 1989) que es un vector cointegrado derivado del plásmido pRi15834, al cual se le insertó el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa ligado al promotor **35S** del virus del mosaico de la coliflor en el segmento TL del T-DNA con una expresión constitutiva de GUS.

El plásmido **pBI121** (Jefferson, 1987) es un vector binario derivado del pBin19 que contiene el gene de GUS, fusionado al promotor 35S y a un sitio de poliadenilación de la región 3' de la nopalina sintetasa(NOS), lo que da una expresión constitutiva de GUS. Además presenta el gene selectivo NPTII fusionado al promotor de NOS, el cual se expresa constitutivamente en células vegetales, y les confiere resistencia a kanamicina. (Fig. 9)

El plásmido **pMR1** es un vector binario construido en este trabajo para evaluar la expresión nódulo específica de GUS. Se contruyó a partir del plásmido pBI101 fusionando la región codificadora de GUS, al promotor del gene de la **leghemoglobina de soya (Lbc3)**. (Stougaard, et al., 1986) (Fig.9) (Ver resultados)

### IV.2. Medios de Cultivo.

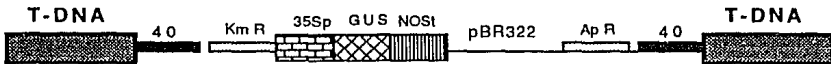
Las cepas bacterianas fueron crecidas en medios ricos. Las cepas de **Agrobacterium** fueron crecidas en el medio de Luria (LA) y las cepas de **Rhizobium** se crecieron en el medio rico de PY. Tablas 1 y 2.

Con respecto a las plantas los medios de cultivo basales utilizados fueron el de Gamborg et al., 1968 (B5), para *Lotus corniculatus* y el de Murashige y Skoog 1962 (MS), para el cultivo de alfalfa. La composición química de ambos medio se muestra en la tabla 3.

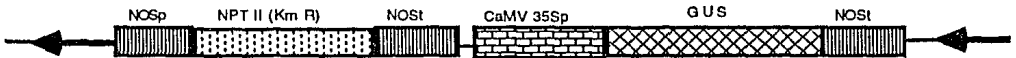
El riego de las plantas, que fueron probadas para nodulación, se realizó con el medio de Jensen (1952) carente de cualquier fuente de nitrógeno (Tabla 4).



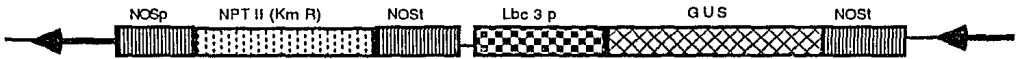
pRI12.- (Hansen, et al., 1989). Vector cointegrando derivado del plásmido pRI15834. CaMV 35Sp-B-Glucoronidasa-NOST integrado en el segmento TL del T-DNA. Expresión constitutiva de GUS.



pBI121.- (Jefferson, et al., 1987). Vector binario derivado del pBin19. Expresión constitutiva de GUS.



pMR1.- Vector binario derivado del pBin19. Expresión nódulo específica.



Fragmento de 2Kb de la región 5' del gene de Leghemoglobina (Lbc3) de soya. (Stougaard, et al., 1990).

FIG. 9. Plásmidos usados para la transformación de *Lotus corniculatus*.

TABLA 1  
COMPOSICION DEL MEDIO PY  
(Bravo y Mora, 1988).

REACTIVO	CONCENTRACION	g/100ml
EXTRACTO DE LEVADURA	0.3 %	0.3 g
PEPTONA DE CASEINA	0.3 %	0.3 g
*CaCl <sub>2</sub>	0.7 M	1 ml

\* Se prepara por separado y se esteriliza por filtración.

TABLA 2  
COMPOSICION DEL MEDIO LURIA

REACTIVO	CONCENTRACION	g/100 ml
PEPTONA DE CASEINA	1.0 %	1.0 g
EXTRACTO DE LEVADURA	0.5 %	0.5 g
NaCl	1.0 %	1.0 g

\* Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 1M.

**Tabla 3.**  
**COMPOSICION QUIMICA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**  
**MURASHIGE Y SKOOG (1962) Y GAMBORG (1968)**

	MS		B5	
Macronutrientes	mg/l	mM	mg/l	mM
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	400.0	5.0	-	-
$\text{KNO}_3$	3535.0	35.0	2528.0	25.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.0	3.0	750.0	5.13
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.0	1.5	500.0	2.02
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.0	1.25	-	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	150.0	1.09
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	2827.0	19.7
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-
Mikronutrientes	mg/l	$\mu\text{M}$	mg/l	$\mu\text{M}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	100.0	3.0	48.5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	100.0	10.0	59.2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	30.0	2.0	6.9
KI	0.83	5.0	0.75	4.52
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	1.03	0.25	1.03
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.19	0.025	0.100
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.105	0.025	0.105
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	100.0	27.8	100.0
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3	100.0	37.3	100.0
Vitaminas	mg/l	$\mu\text{M}$	mg/l	$\mu\text{M}$
Ac. Nicotínico	0.5	4.06	1.0	8.12
Piridoxina HCl	0.5	2.43	1.0	4.68
Tiamina HCl	0.1	0.29	10.0	29.6
Glicina	2.0	26.6	-	-
Inositol	100.0	555.0	100.0	555.0
Sacarosa	30 g/l		30 g/l	
Extracto de levadura	-		-	
Hidrolizado de caseína	-		-	
* Reactivos empleados sin grado de hidratación ** Monohidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )				

**Tabla 4.**  
**MEDIO DE JENSEN PARA NODULACION**

<b>REACTIVO</b>	<b>gr/l</b>
<b>Sulfato de Calcio (<math>\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>)</b>	<b>1.0</b>
<b>Fosfato de potasio dibásico (<math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math>)</b>	<b>0.2</b>
<b>Sulfato de Magnesio (<math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>)</b>	<b>0.2</b>
<b>Cloruro de sodio</b>	<b>0.2</b>
<b>Cloruro férrico</b>	<b>0.1</b>

### III. Obtención de plantas transgénicas de *Lotus*.

El procedimiento utilizado para la generación de plantas transgénicas fue el desarrollado por Petit et al. (1987), en el cual se pueden obtener las plantas transformadas en, aproximadamente 4 meses. De manera resumida, la transformación con *A. rhizogenes* se realizó de la siguiente manera:

a.- Las semillas se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% durante 15 minutos, y posteriormente, se enjuagron con agua destilada estéril.

b.- Las semillas desinfectadas se germinan en cajas de Petri en medio B5 a la mitad de la concentración de sales suplementado con agar al 1.2%, sin sacarosa.

c.- Las plántulas fueron infectadas entre los 7 y 10 días, posteriores a la germinación, causando una lesión en el hipocotilo con la ayuda de una aguja de jeringa previamente pasada por una caja de cultivo con bacterias de *A. rhizogenes* frescas crecidas en LA a 30°C durante 2 días.

d.- A las dos o tres semanas de cultivo, y aparecidas las raíces transformadas, las plántulas se lavaron en un medio líquido B5 con carbenicilina (300 µg/ml) para eliminar o inhibir el desarrollo de *Agrobacterium*.

e.- Las raíces se cortaron y se cultivaron en un medio B5 (tabla 3) con la mitad de su concentración de sales (B5 50%), adicionándole sacarosa al 10% (p/v) dejandose de 20 a 30 días en oscuridad.

f.- Las raíces desarrolladas se subcultivaron en un medio igual al antes mencionado, y fueron expuestas a la luz en condiciones de fotoperiodo y a una intensidad luminosa de, aproximadamente, 3000 lux. En un período de 15 a 30 días se tiene una generación de brotes por un proceso de organogénesis.

g.- Los brotes regenerados se individualizaron y se transfirieron a un medio de cultivo B5 mas sacarosa al 30% (p/v) en las mismas condiciones de cultivo indicadas en los pasos anteriores. Las plántulas enraizaron en aproximadamente dos semanas. Una vez generadas las raíces (2 a 3 cm de longitud) las plantas se transfirieron a macetas con un sustrato de vermiculita-agrolita (1:1) o a bolsas de germinación.

h.- Al segundo día, después de transferidas las plantas transgénicas, se inocularon con *Rhizobium loti* NZP2037 (ver adelante). Seis semanas después se determinó la actividad del gene reportero (GUS) y la actividad de nitrogenasa (ver adelante).

#### IV. Obtención de plantas "compuestas" de *Lotus* y alfalfa.

Con este sistema se obtienen plantas "compuestas", en las que la parte aérea (hojas y tallo) no está transformada, pero la raíz sí. De esta manera, se evita el ciclo de regeneración de las plántulas y se reduce de manera significativa el tiempo de nodulación de raíces transformadas (Hansen et al., 1989). La diferencia con el protocolo anterior es la siguiente: una vez lavadas las plántulas infectadas con *A. rhizogenes*, en el medio B5 líquido (tabla 3) suplementado con carbenicilina, las raíces originales fueron eliminadas y las plantas, "compuestas", con "hairy roots" (ver adelante), fueron transferidas a macetas con vermiculita agrolita (1:1), o a bolsas de germinación. Después de cuatro días de transferidas las plantas "compuestas", presentando sólo las "hairy roots", fueron inoculadas con *R. loti* NZP2037 (ver adelante). Seis semanas después de inoculadas, se determinó la actividad del gene reportero de GUS y la actividad de nitrogenasa (ver adelante).

Este mismo protocolo se utilizó para alfalfa. Los pasos para la obtención de plantas "compuestas" fueron los siguientes:

a.- Las semillas de alfalfa variedad "Valenciana" fueron esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%, durante 15 minutos, y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril.

b.- Las semillas desinfectadas se germinaron en cajas de Petri en un medio MS (Murashige y Skoog), a la mitad de la concentración de sales (tabla 3), suplementado con agar al 1.2% sin sacarosa.

c.- Las plántulas fueron infectadas entre los 7 y 10 días posteriores a la germinación causando una lesión en el hipocotilo con la ayuda de una aguja de jeringa previamente pasada por una caja de cultivo con bacterias de *A. rhizogenes* frescas, crecidas en LA a 30°C durante dos días.

d.- A las dos o tres semanas de cultivo y aparecidas las raíces transformadas, las plántulas se lavaron en un medio líquido MS con carbenicilina (300 ug/ml) para eliminar o inhibir el desarrollo de *Agrobacterium*.

Las plantas "compuestas" fueron transferidas a bolsas de germinación donde fueron inoculadas con *Rhizobium meliloti* 2011, para tratar de nodular las "hairy roots". En algunos casos se adicionaron exudados radicales de la variedad Valenciana, al momento de la inoculación (ver adelante).

#### V. Nodulación de plantas transgénicas de *Lotus* y "compuestas" de *Lotus* y de Alfalfa.

La nodulación se realizó en bolsas de germinación y crecimiento, que se adquirieron de Vaughan's Seed Company, así como en macetas con un sustrato de agrolita vermiculita (1:1). Esta se realizó tanto en plantas transgénicas de *Lotus*, generadas de brotes de raíces transformadas, como en plantas "compuestas" de *Lotus* y alfalfa donde sólo la raíz esta transformada. Una vez eliminado el *Agrobacterium* de las raíces, las plantas se transfirieron a las bolsas de germinación, colocando dos plantas por bolsa, las cuales contenían solución nutritiva de Jensen (1952) (tabla 4) a la que se le adicionó 1.5 mM de nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>), o a macetas a las que sólo se le adiciono el medio de Jensen, sin ninguna fuente de nitrógeno. Cuando fueron necesarios riegos posteriores, se realizaron sólo con la solución de Jensen (sin ninguna fuente de nitrógeno). Las bolsas y macetas con las plantas fueron colocadas en un cuarto de incubación a una temperatura de 24°C ± 2°C, una humedad relativa promedio de 60% y un fotoperíodo de 16 h. de luz por 8 h. de oscuridad. Al cuarto día, posterior a la transferencia, las plantas fueron inoculadas con un cultivo saturado de *Rhizobium loti* NZP2037, crecido por dos días en un medio PY (tabla 1) a 30°C, en el caso de *Lotus* y con *R. meliloti* 2011 en el caso de alfalfa. Cada planta fue inoculada con 2 ml del cultivo de *Rhizobium* permaneciendo en las mismas condiciones ambientales por seis semanas, tiempo que se consideró suficiente para la aparición y desarrollo de los nódulos.

## VI. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE $\beta$ -GLUCURONIDASA

### VI.1. Ensayo fluorométrico

La actividad de fluorescencia de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), en extractos crudos, de hoja, raíz y nódulo, se determinó de acuerdo al protocolo de Jefferson et al., (1987). En este ensayo el sustrato usado para la determinación de GUS fue el 4-metil-umbelferilglucuronido (MUG). Este compuesto sólo es fluorescente cuando es convertido en 4-metil umbeliferona (MU).

Los extractos crudos, de los diferentes órganos vegetales, se prepararon en un buffer de lisis que contiene 50mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 10mM de EDTA, Triton X-100 al 1%, Sarcosil al 0.1% y 10mM de  $\beta$  mercaptoetanol. Para la reacción se incubaron 500  $\mu\text{l}$  de extracto, con 0.1 nM de MUG preparado en un buffer de lisis. Cada reacción enzimática contenía 450  $\mu\text{l}$  de extracto más 50  $\mu\text{l}$  de una solución de 1nM de MUG y se incubó a 37°C. A diferentes tiempos (30, 60 y 120 minutos), se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de la reacción y se transfirieron a un tubo conteniendo 900  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.2 M), con lo cual se detuvo la reacción. La fluorescencia se determinó con un fluorómetro, previamente calibrado con un estandar de MU recientemente preparado, a una longitud de onda de 365 a 455 nm. (Jefferson, 1987). Para cada reacción se realizó un control adicionandole 10  $\mu\text{l}$  de **sacrolactona** 10 mM. Esta es un inhibidor específico de la actividad de GUS (Jefferson, 1987). Por lo que la fluorescencia basal, medida en dicho control, se interpretó como una fluorescencia de fondo que puede estar presente en los extractos vegetales. Se determinó la concentración de proteína total de los extractos con el método de Lowry. (Lowry, et al., 1951). La actividad de GUS se refiere en pmolas de MU/minuto/mg de proteína.

Por otra parte en algunos casos se determinó cualitativamente la actividad de GUS incubando 90  $\mu\text{l}$  del extracto crudo con 10  $\mu\text{l}$  MUG (1 nM) durante toda la noche, a 37°C, deteniendo la reacción con 900  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1M), y observando la fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta (UV).



## VI.2. Ensayo histoquímico y microfotografías.

La localización histoquímica de la actividad de GUS se realizó con el método de Jefferson (1987). El sustrato para la tinción de la proteína rastreadora (GUS), es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronido (X-GLU). La actividad de GUS sobre este sustrato produce un compuesto que al entrar en contacto con oxígeno se dimeriza, para formar un producto insoluble de color azul índigo. Esta dimerización oxidativa es estimulada por el oxígeno atmosférico, y puede ser incrementada fuertemente, utilizando catalizadores de oxidación como Ferrocianida de potasio. Aunque sin el uso de estos catalizadores la reacción es bastante satisfactoria (Jefferson, 1987).

El ensayo histoquímico de GUS se realizó en nódulos completos, en segmentos de raíz y en trifolios recién disectados de la planta, los cuales se incubaron en 0.5 mM de X-Glu, durante toda la noche a 37°C. Para las observaciones al microscopio, de nódulos que presentaron actividad (teñidos de azul), se realizaron cortes con la ayuda de un vibratomo (VIBRATOME, Serie 1000). Los cortes se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico Carls Zeiss 2FI con un sistema fotográfico MC80.

## VII. ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA

El parámetro que se utilizó para determinar la funcionalidad de los nódulos fué la actividad de la nitrogenasa. Esta enzima es capaz de reducir acetileno a etileno, y ambos gases pueden ser rápidamente medidos en muy bajas concentraciones, por la técnica de Cromatografía de gases. Por tanto, para evaluar la actividad de los nódulos, se midió la reducción del acetileno con la ayuda de un cromatógrafo de gases. Las plantas noduladas, transformadas y "compuestas", se colocaron en frascos de vidrio con una capacidad de 45 ml, sellados con un tapón de hule. En cada frasco se adicionó 0.5 ml de acetileno. A diferentes tiempos se tomó una muestra de gas de los distintos frascos y se inyectó en el cromatógrafo de gases (Varian 3300).

El cromatógrafo separa y cuantifica el acetileno (sustrato) y el etileno (producto) presentes en cada muestra problema, inyectada. La estimación del acetileno reducido por unidad de tiempo se realiza con la siguiente formula:

$$\frac{(\text{Area BC})(44.6)}{120415} = R_1$$

$R_1$  = nmoles de acetileno totales/minuto

Area BC = Area bajo la curva de acetileno

44.6 = Cantidad de nmoles de acetileno en un área bajo de la curva de 120415

## VII. Caracterización de la eficiencia de la simbiosis en diferentes variedades de alfalfa.

Las semillas de alfalfa (100 de cada variedad) fueron desinfectadas superficialmente, con una solución de hipoclorito de calcio, comercial, al 30% durante 5 minutos y, posteriormente, se le practicaron cuatro enjuagues con agua destilada estéril (Fuentes et al., 1993). Las semillas fueron germinadas en bolsas de crecimiento, colocando 10 semillas por bolsa. Cuatro días después de la germinación, las plántulas fueron inoculadas con una suspensión de *Rhizobium meliloti* 2011, proveniente de un cultivo crecido durante toda la noche en un medio rico de PY y ajustado a una D.O.<sub>540</sub> de 1.0 (100 X 10<sup>8</sup> células/ml). A cada bolsa se le adicionaron 10 ml de la suspensión. Las plantas fueron colocadas en un cuarto de incubación a una temperatura de 25°C con un fotoperiodo de 16/8 hrs. y una intensidad luminosa de aproximadamente 3000 lux. Después de seis semanas, posteriores a la inoculación, se realizaron las mediciones de: número de nódulos, peso seco del área foliar, y actividad de nitrogenasa, a grupos de cinco plantas de cada variedad.

## **IX. Obtencion de exudados radicales de alfalfa.**

Los exudados radicales de Valenciana se obtuvieron colocando 150 semillas previamente desinfectadas en una coladera de aluminio dentro de un recipiente de vidrio que contenia 50 ml de agua destilada estéril, para su germinación y desarrollo. Los cultivos se incubaron durante cinco días, en las condiciones antes mencionadas. La solución acuosa, donde se encontraban sumergidas las raíces, se colectó y centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos para evitar la presencia de algún agente de contaminación. El sobrenadante se decantó y se utilizó para adicionarse a las bolsas. Estos exudados siempre se manejaron en condiciones de esterilidad y los exudados que se observaban turbios fueron desechados para evitar problemas de contaminación dentro de las bolsas de crecimiento.

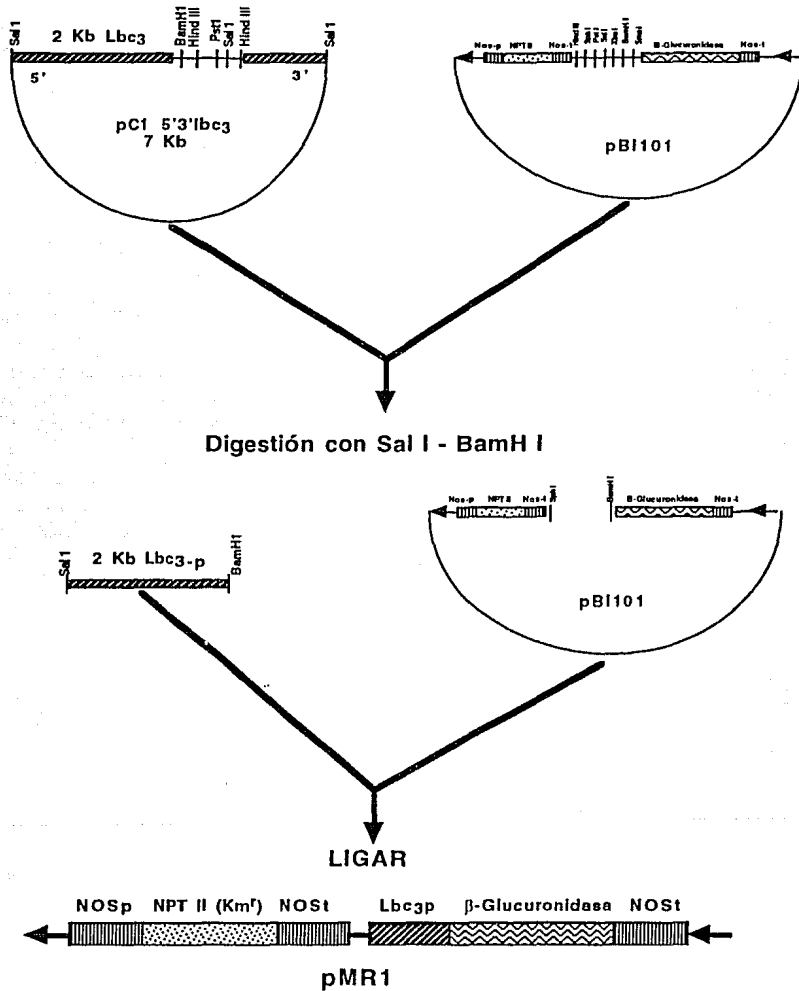
## RESULTADOS Y DISCUSION

### I. Construcción del gene quimérico con el promotor de nódulo específico (promotor de la leghemoglobina de soya).

La leghemoglobina es una nodulina muy abundante en los nódulos. Su promotor es fuerte y hay una gran cantidad de transcritos de este gene. Se ha observado que la expresión de GUS bajo la acción de este promotor es alta (Stougaard et al., 1987). Para validar los sistemas de transformación genética que se proponen (*Lotus* y alfalfa), se decidió comparar la expresión del gene reportero de GUS, a partir de un promotor constitutivo, con la expresión de un promotor específico de la simbiosis. Para esto último, se procedió a construir una fusión del promotor de la leghemoglobina de soya ( $lbc_3$ ), con la región codificadora de GUS.

El fragmento de DNA que corresponde al promotor del gene de leghemoglobina, de aproximadamente 2 Kb, se aisló del plásmido denominado **pCI 5'3'Lbc<sub>3</sub>** (donado por el Dr. Mario Rocha). En este fragmento, se encuentra contenido el promotor completo de  $Lbc_3$  y se encuentra clonado en el plásmido pBR322, en un sitio de **SalI**, además de un "polilinker" (Fig. 10). El promotor se obtuvo en un fragmento de **SalI-Bam HI**. Este fragmento se clonó frente a la región codificadora de la  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS) en un sitio de **SalI-Bam HI** del plásmido binario **pBI101** (Jefferson, 1987), que es derivado del pBin19 (Bevan, 1984), que presenta la región codificadora de GUS carente de promotor. Este plásmido presenta además el gene selectivo de **NPT II**, fusionado al promotor de NOS, el cual le da resistencia a Kanamicina (Km). Como resultado, se obtuvo el plásmido **pMR1** (Fig. 9 y 10). El plásmido **pMR1** fue introducido en *Agrobacterium rhizogenes* (C58 CI/pRI15834) por medio de una cruce triparental.

En el caso del plásmido con el promotor constitutivo fusionado a GUS, se utilizó el plásmido **pBI121** (Jefferson, 1987), que presenta fusionado el promotor **35S** del virus del mosaico de la coliflor, a la secuencia codificadora de la enzima de GUS. Este plásmido fué introducido a *Agrobacterium* de la misma forma que el **pMR1**. Así pues, las cepas de *A. rhizogenes* que se usaron en el sistema binario son: *A. rhizogenes* **C58CI/pRI15834/pMR1**, sistema binario con un promotor nódulo-específico-GUS; y *A. rhizogenes* **C58CI/pRI15834/pBI121** sistema binario con un promotor constitutivo fuerte-GUS.



**FIG. 10. Esquemización de la construcción del plásmido pMR1 con el promotor nódulo específico.**

## II. Analisis de la expresi3n de GUS en plantas transg3nicas de *Lotus*.

Uno de los objetivos de este trabajo fue implementar el sistema modelo de obtenci3n de plantas transg3nicas de *Lotus corniculatus* mediado por *Agrobacterium rhizogenes* desarrollado por Petit et al., (1987). Los par3metros que se cuantificaron fueron: el porcentaje de infecci3n (formaci3n de "hairy roots"), el porcentaje de cotransferencia usando sistemas binarios, lo que significa la frecuencia con que se transfiere y se integra a la misma c3lula vegetal, tanto los genes de int3res presentes en el vector binario, como los genes que confieren el fenotipo de "hairy roots", presentes en el pl3smido Ri. Adem3s, de comparar con el sistema cointegrado en el que se espera un 100% de integraci3n de ambos tipos de genes.

El proceso de infecci3n de *Agrobacterium rhizogenes* se puede considerar que se encuentra en relaci3n con la manera en que se realiza la herida en las pl3ntulas que van a ser transformadas. La infecci3n de las plantas utilizadas, consisti3 en hacer una incisi3n en el hipocotilo de las pl3ntulas con la ayuda de una jeringa previamente impregnada de la cepa bacteriana de *A. rhizogenes*. Se probaron diferentes formas de causar la lesi3n; raspando el hipocotilo con la jeringa, decapitando las pl3ntulas y causando una lesi3n profunda sin cortar el hipocotilo por completo. Se observ3 un mayor n3mero de raices transformadas en aquellas plantas a las que se les caus3 una lesi3n profunda, con respecto a aquellas donde la incisi3n hecha por un raspado en el hipocotilo de las pl3ntulas fue muy superficial. La respuesta de la planta a una lesi3n, conduce a la secreci3n de compuestos fen3licos, mismos que inducen la expresi3n de los genes *vir* de *Agrobacterium* responsables de los procedimientos para la transferencia del T-DNA, por lo que una adecuada lesi3n pudiera aumentar la producci3n de compuestos inductores de la expresi3n e los genes *vir*, por parte de la planta (Zambrisky, et al., 1983).

En la tabla 5 se indica el porcentaje de infecci3n para cada cepa. Los valores obtenidos para todas las cepas estuvieron cerca del 30% de infecci3n encontrado por Hansen et al.(1989) aunque se observ3 porcentaje ligeramente mayor, en la cepa con el vector cointegrado, que no se consider3 significativo (Tabla 5). No se ha informado de alguna correlaci3n en la eficiencia de infecci3n en cepas que contengan un vector binario vs, uno cointegrado.

Las raíces velludas aparecieron entre la segunda y tercera semana posterior a la infección. En algunos casos un pequeño callo precedía a la formación de la raíz transformada. En casos muy raros (tres de aproximadamente 450 plántulas infectadas), en el sitio de la herida, se presentaron eventos organogénicos que dieron origen a una nueva planta y no la formación de las raíces velludas que eran esperadas. Las plantas donde hubo la formación de raíces velludas fueron transferidas a un medio de cultivo líquido (B5 al 50%), adicionado con carbenicilina, 500 ug/ml, para eliminar la presencia de *Agrobacterium*. A diferencia del protocolo original, las plántulas se lavaron en un matraz con el medio de cultivo a una agitación de 50-100 rpm, por dos días. Se observó que los períodos mas largos (cuatro días con un cambio a los dos días), dañaron de manera severa las plántulas. Así mismo, se eliminó la presencia de sacarosa en el medio, dado que facilitaba la presencia de hongos que se desarrollaban sobre las raíces.

Las raíces transformadas, una vez lavadas, fueron separadas de las plántulas y cultivadas en un medio B5 al 50% de su concentración normal y se incubaron en oscuridad. Posteriormente se transfirieron a la luz donde se presentó el evento organogénico que resultó en la generación de plántulas, a partir de raíces transformadas. Se probó la nodulación de estas plántulas inoculándolas con *Rhizobium loti* NZP2037.

Los nódulos aparecieron en la primera semana posterior a la inoculación. El desarrollo de las plantas transgénicas fue aceptable y el follaje presentó el color verde, característico de una asociación simbiótica efectiva. Los valores que se muestran en la tabla 6, sobre el número de nódulos y la actividad de nitrogenasa de las plantas transgénicas, se determinaron en plantas de 5 a 10 líneas diferentes (brotes generados de raíces transformadas distintas). En las plantas transformadas con los diferentes plásmidos se observó un valor similar en la nodulación y en la actividad específica de nitrogenasa (Tabla 6).

Al mismo tiempo se evaluó la actividad de GUS en las diferentes plantas transgénicas obtenidas. La presencia de actividad de GUS en plantas transgénicas derivadas de vectores binarios de transformación, indica el porcentaje de cotransformación. Los valores obtenidos para ambos vectores son similares. Estos valores son similares a los reportados por Stougaard (1987), donde encuentra un 60% de cotransferencia en plantas transformadas con un sistema binario. En ese reporte las plantas se regeneraron en presencia de selección (Km), y la cotransformación se determinó como el porciento de "hairy roots" que dieron origen a plántulas Km<sup>r</sup>. La diferencia

encontrada en el porciento de cotransferencia entre este trabajo y el encontrado por Stougaard (1987) puede deberse a la diferencia en la metodología utilizada ya que si se usa un agente selectivo como lo es la kanamicina, solo se detectara en aquellas raíces que conservan el gene selectivo, a diferencia de cuando no se usa selección, como en este trabajo, en el que el gene reportero utilizado pudiera no ser estable.

Las figuras de la 11 a la 14, muestran la actividad de GUS en los distintos tejidos (hoja, raíz y nódulo) de diferentes plantas transgénicas obtenidas con uno de los plásmidos probados. La figura 11, muestra la actividad de GUS de ocho diferentes plantas transgénicas usando el vector cointegrado pRi12. La figura 12 muestra la actividad encontrada en el mismo número de plantas obtenidas con el vector binario pBI121 y en la figura 13 se muestran los resultados de cinco plantas obtenidas con el plásmido pMR1. De estas figuras se puede deducir que existe una variación importante de la expresión de GUS, en cada uno de los individuos analizados. Esta diferencia de expresión de la enzima GUS, llega a ser hasta de 35 veces observada entre la planta siete y dos de la figura 12. Se ha reportado que existe una variación de la actividad de la expresión en diferentes líneas transformadas. A este efecto se le conoce como **efecto posicional**, que se refiere a que los niveles de expresión del gene rastreador se ven fuertemente influidos por el lugar donde se integró al genoma vegetal. Además otra causa de dicha variación puede ser el número de copias del gene reportero presente en el genoma de la planta, ya sea en el mismo sitio, como producto de replicaciones del gene al momento de la integración o en diferentes sitios como producto de diferentes eventos de integración. (Beach y Gresshoff, 1988).

No obstante las variaciones que presentaron los diferentes individuos que resultaron transformados, en la expresión de GUS (Fig. 11 a 13), se puede establecer diferencias entre la expresión constitutiva vs, la expresión nódulo específica del gene reportero.

En las plantas transformadas con el plásmido pRi12 (Fig. 11), como las del plásmido pBI121 (Fig. 12), se observa la expresión (como era de esperarse), en todos los tejidos analizados de todas las plantas. La figura 14 muestra los valores promedio y desviación estandar de la actividad de GUS en cada uno de los tejidos. Se observa que la actividad específica de GUS dirigida por el promotor constitutivo, es mayor en el nódulo que con respecto a parte aérea y raíz, en este orden. Esta diferencia de actividad específica de GUS en los diversos tejidos podría



TABLA 5.

VALORES DE INFECCION Y COTRANSFORMACION  
EN PLANTAS TRANSGENICAS DE *Lotus corniculatus*.

Plásmidos en la cepa C58CI de <i>A. rhizogenes</i> .	INFECCION <sup>1</sup> (%)	COTRANSFORMACION <sup>2</sup> (%)
pRi15834/pMR1	18.9 ± 7.9	45.0
pRi15834/pBI121	19.6 ± 8.7	47.9
pRi12	28.23 ± 12.8	

<sup>1</sup> Se refiere al porcentaje de plantas con aparición de "hairy roots" con respecto al número total de plantas infectadas. Promedio de 4 experimentos.

<sup>2</sup> Porcentaje de plantas transgenicas que presentaron actividad de GUS en algun tejido de todas las plantas regeneradas en un medio sin selección.

TABLA 6.

NODULACION Y ACTIVIDAD DE NITROGENASA EN PLANTAS TRANSGENICAS DE  
*Lotus corniculatus* MEDIADAS POR *Agrobacterium rhizogenes*  
CONTENIENDO DIFERENTES PLASMIDOS.

PLASMIDOS	NODULACION*	ACT. ESPECIFICA DE NITROGENASA* (nmol/min/mg prot.)
pRi15834/pMR1	7.35 ± 2.3	6.4
pRi15834/pBI121	5.53 ± 1.9	2.5
pRi12	4.18 ± 1.1	1.7

\* Número de nódulos promedio por planta.

\* Detreminada por el ensayo de reducción de acetileno. Valor promedio por planta

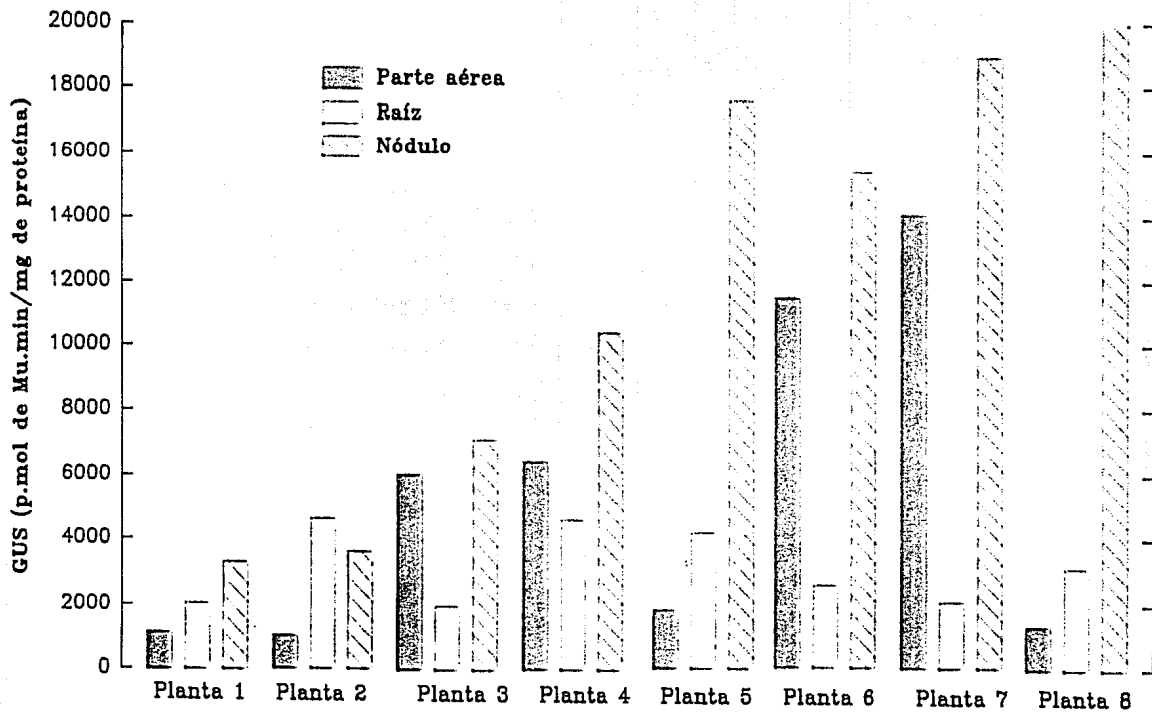


Figura 11.

Actividad de GUS en plantas de *Lotus corniculatus* transformadas con el plásmido pRi12.

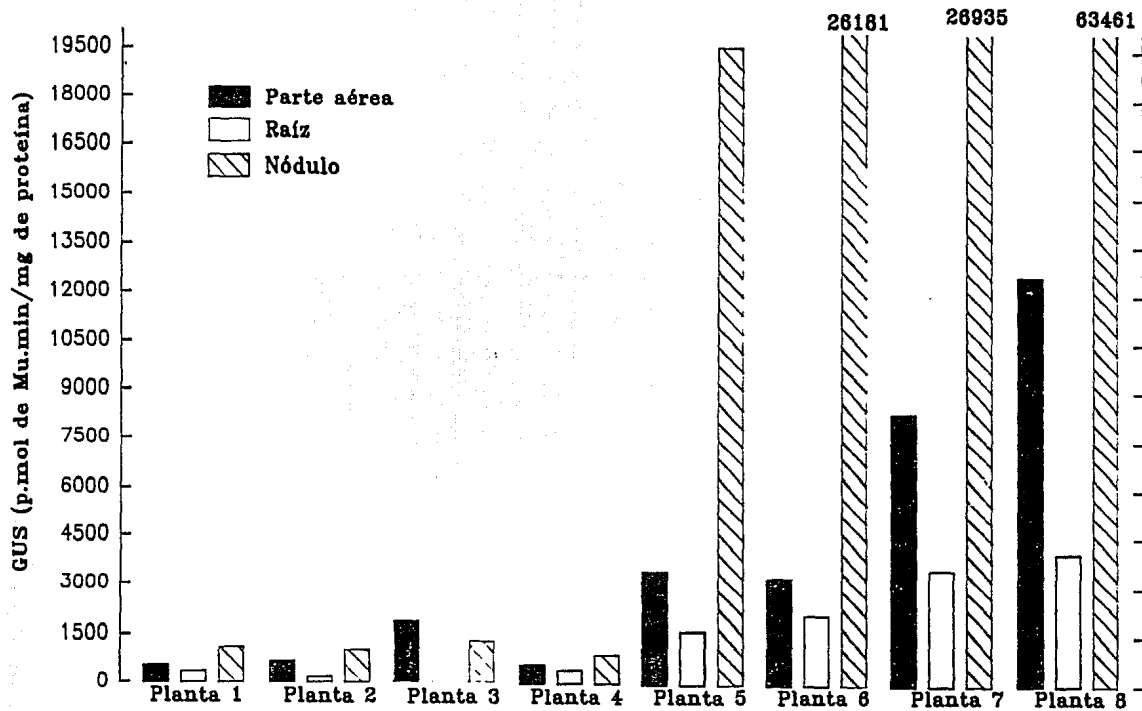


Figura 12.

Actividad de GUS de plantas de *Lotus corniculatus* transformadas con el plásmido pBI121.

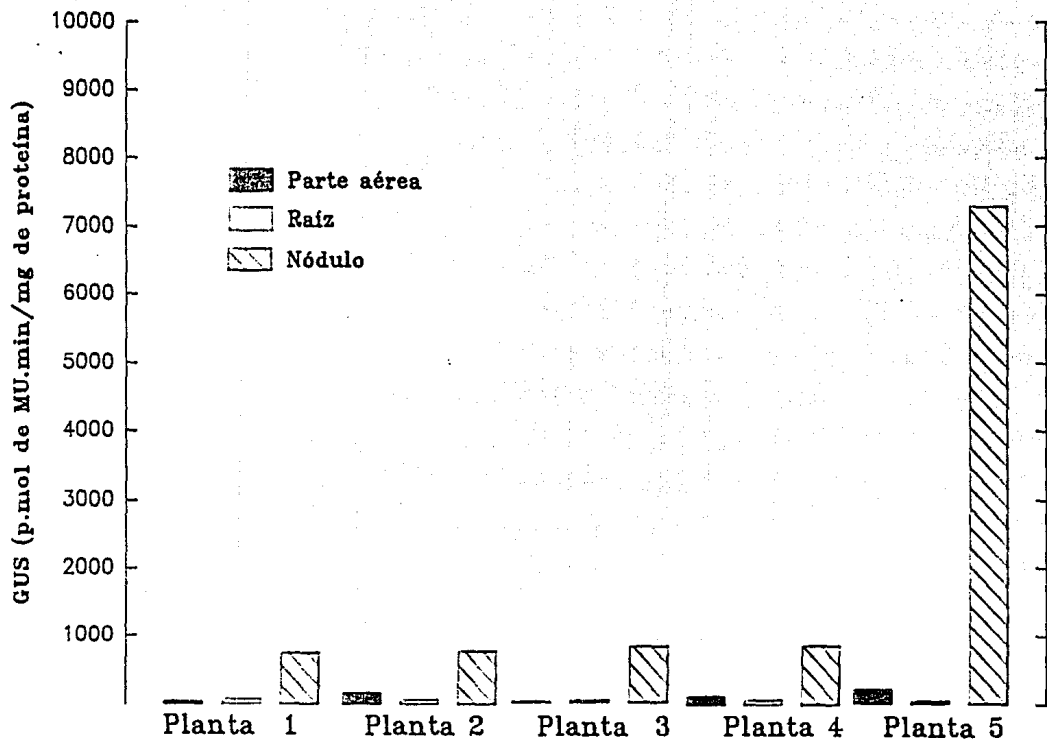


Figura 13.

Actividad de GUS en plantas de *Lotus corniculatus* transformadas con el plásmido pMR1.

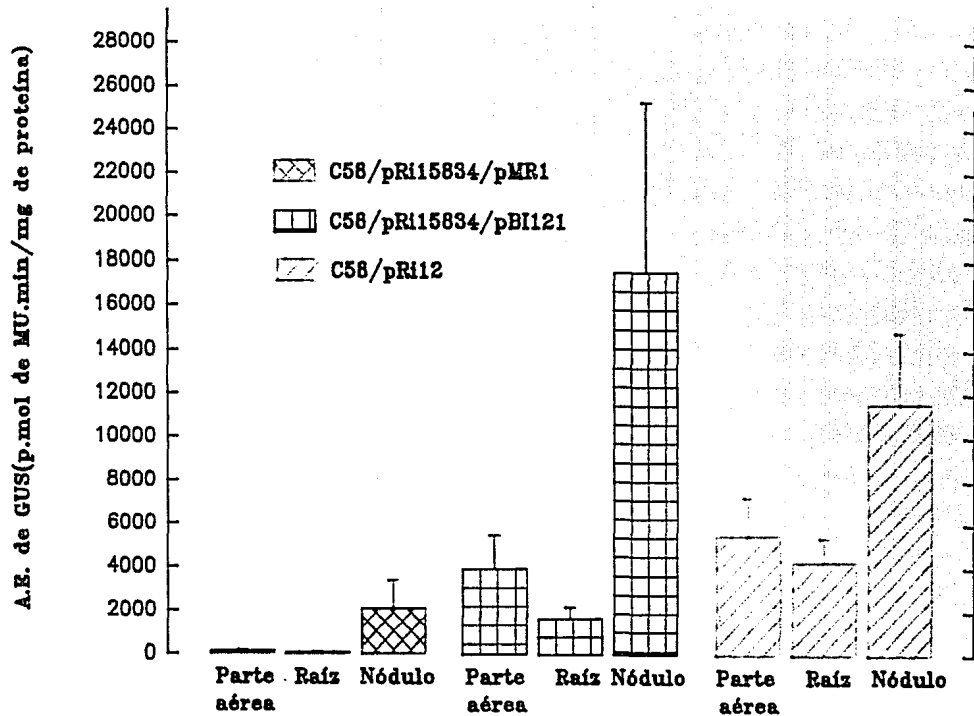


Figura 14.  
 Actividad de GUS en plantas transformadas  
 de *Lotus corniculatus*\*

\* Promedio de actividad de cuando menos 10 plantas.

deberse a diferentes factores. Uno de ellos es que la actividad específica de GUS se estima por mg de proteína total, y las diferentes células vegetales pueden tener concentraciones distintas de proteína entre sí. Se ha propuesto que es mejor estimar la actividad específica del gene de GUS por ug/DNA. Por otra parte se sabe que el promotor 35S se expresa de manera preferencial en tejidos vasculares (Benfey et al., 1989). Los nódulos presentan una gran cantidad de vasos que son necesarios para recibir los fotosintatos por parte de la planta, y para transportar los productos nitrogenados del nódulo hacia otras partes de las plantas, lo cual puede explicar una elevada expresión de 35S-GUS en nódulos (Fig. 14).

Con respecto a la actividad específica de GUS dirigida por el promotor nódulo específico, promotor Lbc<sub>3</sub>, (Fig. 13), el patrón de expresión es muy distinto a lo anteriormente descrito. En ninguna de las plantas probadas se registró actividad de GUS en hoja o raíz, y sólo se determinó actividad en los nódulos formados en estas plantas (Fig. 13 y 14).

Estos resultados demuestran la validez del sistema experimental ya que la expresión fue órgano específica. La figura 14, muestra que la actividad específica de GUS en el nódulo es menor en plantas transformadas con el plásmido pMR1 que con los otros dos plásmidos. Además de los puntos ya mencionados, esto puede deberse a que en el plásmido con el promotor constitutivo la expresión de GUS se manifestaría desde el inicio de la formación del nódulo hasta la senescencia del mismo, y dado que GUS es una enzima muy estable ésta pudiera estarse acumulando. Por otra parte, la actividad del promotor de leghemoglobina comienza cuando el nódulo empieza a ser funcional, esto es entre los 12 y 18 días de iniciado el proceso de nodulación.

Las figuras 15 y 16, muestran las micrografías de diferentes tejidos de las plantas transformadas, en los que se practicó el ensayo histoquímico de GUS y que permiten analizar la expresión del gene a nivel celular.

En las plantas transgénicas, con el promotor 35S, se expresa de manera clara en raíz, preferencialmente en los tejidos vasculares (Fig. 15 a y b). En el nódulo, con este mismo promotor se observa una expresión de manera preferencial en los haces vasculares y en la corteza del nódulo (Fig. 15) y muy poca expresión en la zona interna del nódulo. En un acercamiento, solo se observan algunas células teñidas de la parte central del nódulo, que pueden corresponder a células no infectadas (Fig. 15c).



FIGURA 15.

Actividad histológica de GUS, en nódulos de plantas de *Lotus* transformadas con el plásmido pBI121 (promotor constitutivo).

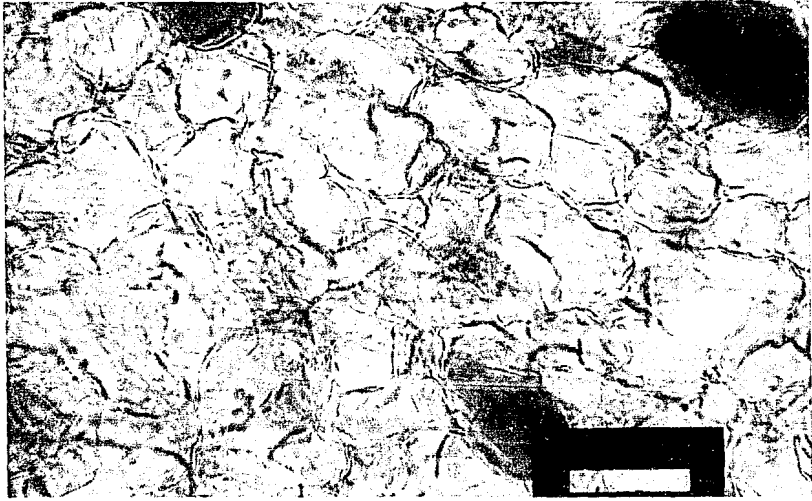


FIGURA 15.

Actividad histológica de GUS, en nódulos de plantas de *Lotus* transformadas con el plásmido pBI121 (promotor constitutivo).



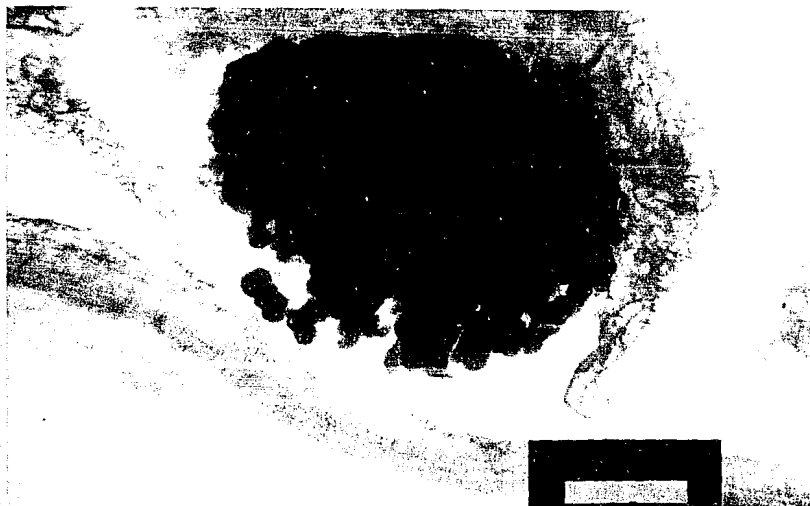
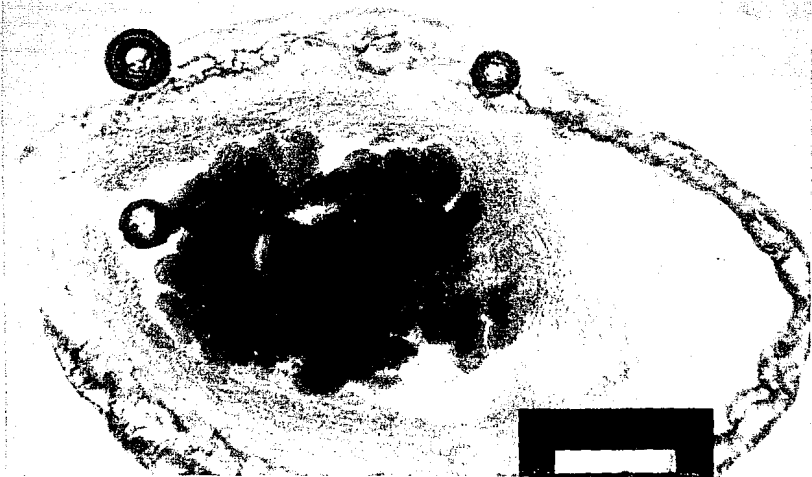


FIGURA 16.

Actividad histológica de GUS, en nódulos de plantas de *Lotus* transformadas con el plásmido pMR1 (promotor órgano-específico).

En los nódulos de plantas transformadas con el plásmido, conteniendo el promotor de *Lbc<sub>3</sub>*, nódulo específico, la actividad de tinción es completamente diferente. No hay expresión en las células de corteza, tampoco en la raíz (Fig. 16b), y la actividad se concentra en las células de la zona central del nódulo, las cuales corresponderían a células infectadas (Fig 16a).

### III. Análisis de la expresión de GUS en plantas "compuestas" de *Lotus*.

Las plantas "compuestas", a las cuales se les eliminó la raíz principal, se inocularon con *Rhizobium loti* NZP2037. El porcentaje de nodulación fue de, aproximadamente, el 50% y los ensayos de actividad de GUS sólo se realizaron en aquellas plantas que presentaron formación de nódulos. La tabla 7, muestra que aquellas plantas que nodularon presentaron un número de nódulos y actividad de nitrogenasa, similares con respecto a las plantas transgénicas.

Las plantas "compuestas" se obtuvieron utilizando las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* con vectores binarios, con el promotor constitutivo (pBI121) y con el promotor nódulo específico (pMR1). En ambos, no se detectó actividad de GUS en la parte aérea, tal como se esperaba. Se observó una variación individual de la expresión de GUS en las plantas analizadas con ambos promotores (Figs. 17 y 18). En la figura 17, se observa que la actividad de GUS en plantas "compuestas", derivadas del plásmido con el promotor 35S se expresa tanto en raíz como en el nódulo. El promedio de actividad es mayor en el nódulo que en la raíz (Fig. 19), similarmente a lo observado en plantas transgénicas obtenidas con el mismo plásmido (Fig. 14). Sin embargo, en el caso de las plantas "compuestas" el valor de actividad de GUS en el nódulo, es aproximadamente 10 veces menor con respecto a la actividad de GUS en nódulos de plantas transgénicas (Figs. 14 y 19). Una posible explicación a esta diferencia observada, es que si en el número de plantas "compuestas" analizadas (3 plantas, ver figura 17), se hubiese presentado la misma situación que en las plantas transgénicas 1, 2 y 3 obtenidas con el mismo plásmido donde se observaron bajos niveles de expresión de GUS (Fig. 12).

Las plantas "compuestas" transformadas con el plásmido pMR1, no mostraron actividad específica de GUS en la raíz y sólo presentaron una gran actividad en el nódulo (Fig. 18).

El valor promedio de esta elevada actividad de GUS (Fig. 19) es, aproximadamente, 30 veces mayor que el valor promedio en nódulos de plantas transgénicas obtenidas con el mismo

**TABLA 7.**

**NODULACION Y ACTIVIDAD DE NITROGENASA EN PLANTAS "COMPUESTAS"  
*Lotus corniculatus* MEDIADAS POR *Agrobacterium rhizogenes*  
 CONTENIENDO DIFERENTES PLASMIDOS.**

PLASMIDOS	NODULACION*	ACT. ESPECIFICA DE NITROGENASA* (nmol/min/mg prot.)
pRi15834/PMR1	3.4 ± 1.7	2.5
pRi15834/pBI121	4.5 ± 2.0	5.5

\* Número de nódulos promedio por planta.

\* Determinada por el ensayo de reducción de acetileno. Valores promedio por planta.

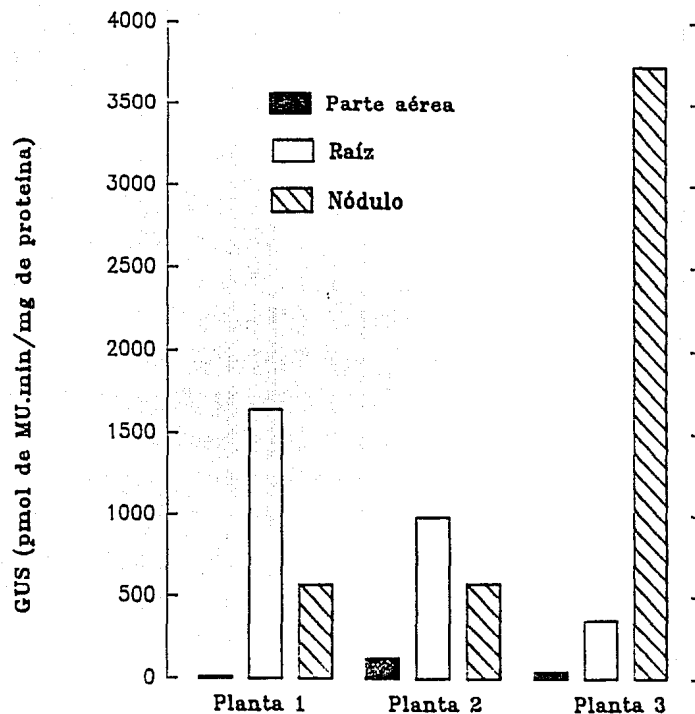


Figura 17.  
Actividad de GUS en plantas "compuestas" de  
*Lotus corniculatus* transformadas con el plásmido pBI121.

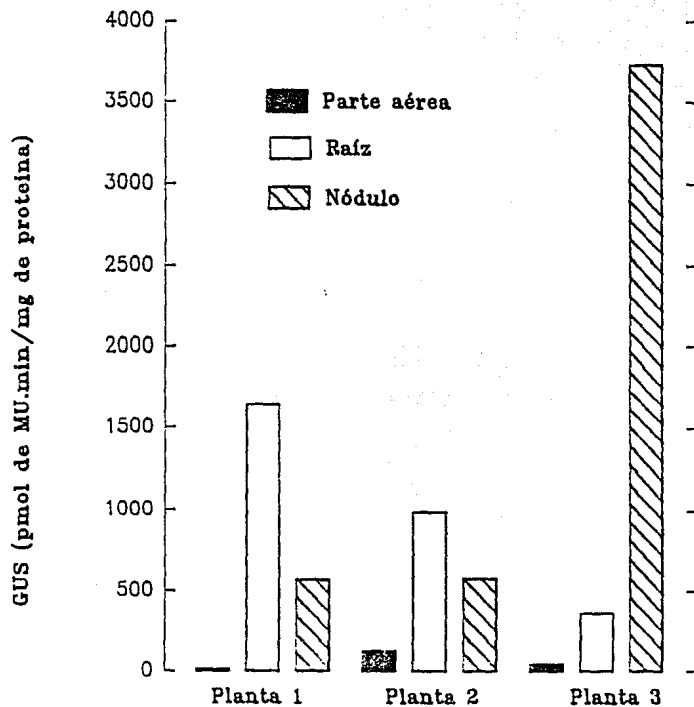


Figura 17.  
 Actividad de GUS en plantas "compuestas" de  
*Lotus corniculatus* transformadas con el plásmido pBI121.

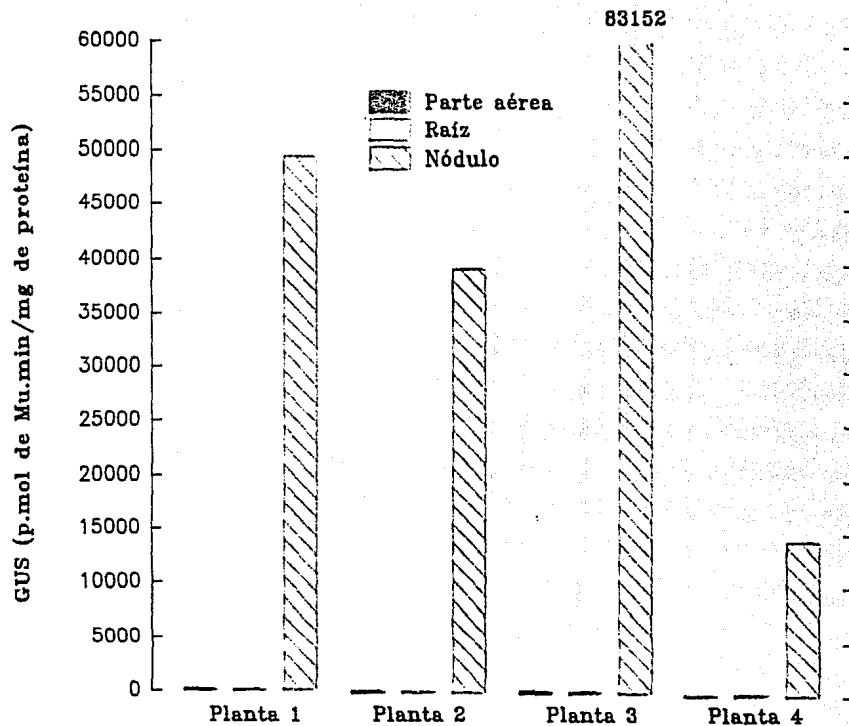


Figura 18.

Actividad de GUS en plantas "compuestas" de *Lotus corniculatus* transformadas con el plásmido pMR1

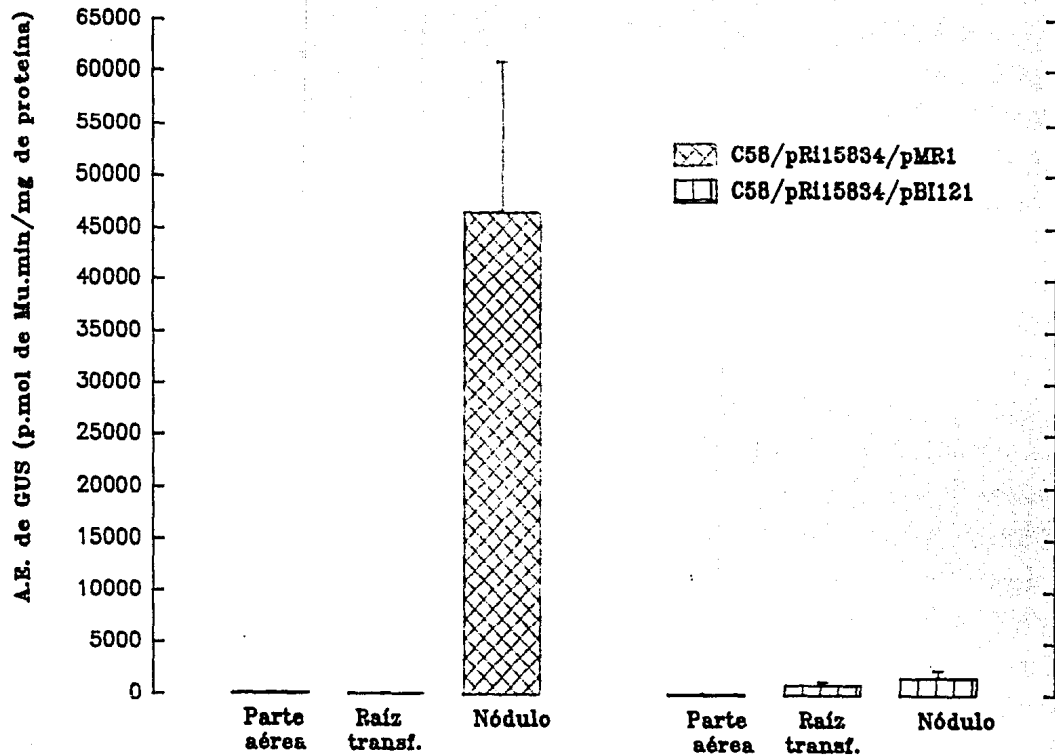


Figura 19.  
 Actividad de GUS en plantas "compuestas" de *Lotus corniculatus*.

plásmido (Fig.14). No hay datos en la literatura, donde se compare la actividad nódulo específica de GUS en plantas "compuestas" vs. plantas transgénicas de *Lotus*, y que permitan explicar los resultados obtenidos en este trabajo (Fig. 14 y 19).

La mayor actividad de GUS en nódulos, de plantas "compuestas" vs. plantas transgénicas, obtenidas con el plásmido pMR1 (Figs. 14 y 19), podría relacionarse con la pérdida de copias del gene de GUS debido, a los procesos de organogénesis que originaron las plantas transgénicas. Por otra parte, se debe considerar que las "hairy roots" son fisiológicamente distintas a las raíces normales, ya que conservan los genes del T-DNA del plásmido Ri, a diferencia de las plantas transgénicas, que suelen perderlos o modificarlos por parte de la planta. Esto pudiera traer como consecuencia diferencias en la expresión de promotores, tejido específico de raíz, o nódulo en estas raíces transformadas.

#### IV. Obtencion de plantas compuestas de Alfalfa.

Se decidió caracterizar a diferentes variedades de alfalfa (*Medicago sativa*) con respecto a la eficiencia de simbiosis con *Rhizobium meliloti* 2011; nueve de las cuales son cultivadas en la zona central del país. La eficiencia simbiótica fue evaluada en tres aspectos: capacidad de nodulación (número de nódulos), productividad (peso seco del area foliar), y fijación de nitrógeno (actividad de nitrogenasa). Las variedades utilizadas mostraron diferencias en cuanto a su capacidad de nodulación (Fig. 20). Se observo una clara variación, en el número de nódulos formados entre las variedades más eficientes, Valenciana e Inia 76, que presentaron una capacidad de nodulación dos veces mayor que las variedades Bajío 76, San Joaquín, Velluda Peruana e Iroquois que mostraron ser las menos eficientes (Fig. 20). En cuanto a la productividad, se observó una correlacion entre el follaje producido por las plantas y con la capacidad de nodulación. Las variedades que mejor nodularon tambien mostraron que los valores de peso seco fueron de 1.5 a 3 veces mayores que los valores detectados en las variedades con menor número de nódulos (Fig. 20). Sin embargo, no se estableció una correlación de las mejores noduladoras, en cuanto a la actividad total de nitrogenasa, porque tanto Valenciana como Inia 76 mostraron una actividad baja de nitrogenasa con respecto a las otras variedades, sólo siendo superior a Velluda Peruana e Iroquois (Fig 20).



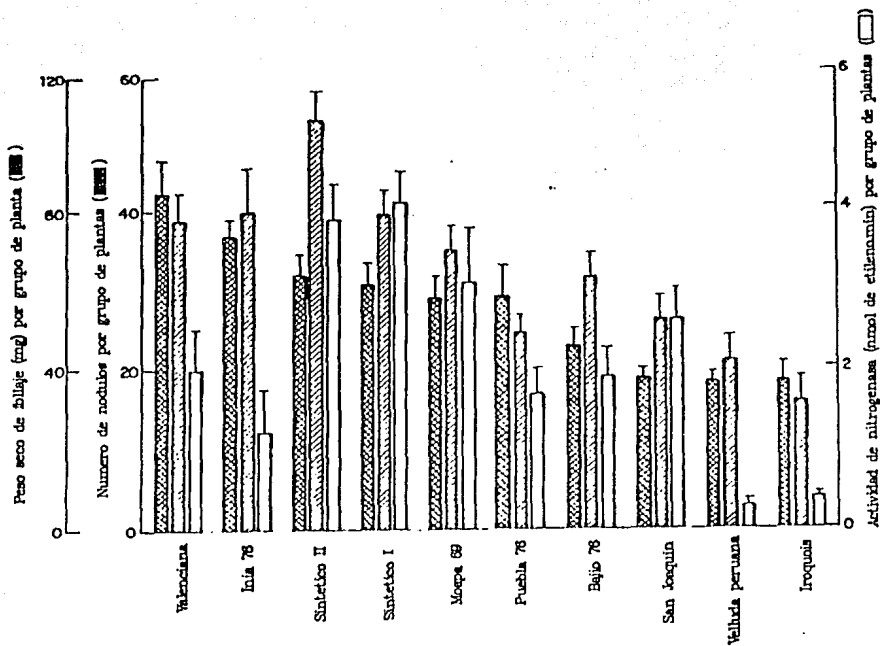


Fig. 20. Valores de nodulación, peso seco y actividad de nitrogenasa de diferentes variedades de alfalfa, inoculadas con Rhizobium meliloti 2011.

Las plantas de alfalfa utilizadas para los ensayos de transformación fueron de la variedad Valenciana, la cual mostró una gran capacidad para establecer una asociación simbiótica con *Rhizobium meliloti* 2011 (Fig. 20).

El protocolo de infección de las plantas fue haciendo una incisión en el hipocotilo de plantas de 7 a 10 días de edad. El porcentaje de infección fue bajo (9%). Aunque, en general, las diferentes especies de leguminosas son susceptibles a ser infectadas por *Agrobacterium*; es común que haya diferencias de susceptibilidad con respecto a las diferentes cepas de *Agrobacterium*. En el caso de las plantas de alfalfa variedad Valenciana infectadas con la cepa C58C1/pRi12 es posible que su susceptibilidad a esta cepa fuera baja. Esta baja susceptibilidad puede estar influenciada por una baja concentración en los compuestos fenólicos liberados por la planta, como respuesta ante una lesión. Dado que la inducción de los genes *vir* se da por compuestos fenólicos que la planta excreta, se decidió probar la adición de acetosiringona (50 M) al medio de crecimiento de *Agrobacterium*. Un nuevo lote de plantas fue infectado con la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* C58C1/pRi12, crecida en un medio de Luria adicionado con 50 uM de acetosiringona. Los valores de infección se incrementaron hasta un 36%. Estos datos sugieren que los compuestos fenólicos liberados por las plantas de alfalfa (de la variedad Valenciana), pueden ser limitantes para la inducción de los genes *vir* de la cepa de *Agrobacterium* probada. Las raíces que se formaron en las plantas de alfalfa fueron lavadas, para evitar la presencia de *Agrobacterium*, de la misma manera descrita para *Lotus corniculatus*. A las plantas que presentaron "hairy roots" les fue eliminada la raíz principal, y fueron colocadas en un medio líquido de Jensen, en bolsas de crecimiento. Cuatro días después de transferidas, se inocularon con una solución de *Rhizobium meliloti* 2011. No hubo formación de nódulos aún después de cuatro semanas, cuando ya las plantas presentaban un fuerte deterioro por la falta de carbono y/o nitrógeno.

Se efectuó un ensayo posterior en el cual se adicionó succinato 50 mM al medio líquido. Esto se hizo con el objetivo de proveer de una fuente de carbono externa a las "hairy roots" las cuales pudieran estar desprovistas de carbono y, por tanto sería limitante para la nodulación. Se ha encontrado que el succinato adicionado al medio de cultivo puede ser incorporado a los nódulos, y ser utilizado como fuente de carbono.

En esta condición, la sobrevivencia de las plantas "compuestas" de alfalfa aumentó. Sin embargo, no se observó el proceso de nodulación.

Como se ha mencionado, los compuestos flavonoides son inductores de los genes de nodulación. Se observó que exudados radiculares de las dos variedades de alfalfa más eficientes, Valenciana e INIA 76, presentan una mayor capacidad de inducción de los genes *nod* de *Rhizobium* que las variedades menos eficientes lo cual pudiera ser limitante para el proceso de nodulación (datos no presentados).

Dado que sabemos que las "hairy roots" son fisiológicamente distintas a las raíces normales, se pensó que la excreción de flavonas no fuera suficiente para inducir los genes *nod* y por lo tanto se estuviera limitando el proceso de nodulación; por tanto se decidió adicionar exudados de raíz de plantas normales de Valenciana a las bolsas de crecimiento donde se inoculó un nuevo lote de plantas "compuestas" de alfalfa. Las plantas alcanzaron las 6 semanas de desarrollo en el medio conteniendo succinato mas los exudados radiculares; sin embargo el proceso de nodulación no se presentó. Beach y Greshoff (1988), reportan que las raíces transformadas de plantas "compuestas" de alfalfa y trébol perdieron su capacidad de nodulación debido a la presencia del T-DNA del plásmido Ri en el tejido radicular transformado, en razón de que las plantas inoculadas con *Rhizobium* fueron incapaces de formar nódulos.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados mostrados en este estudio, se puede concluir lo siguiente:

- La manera de lesionar las plántulas, para la infección con *Agrobacterium*, tiene un efecto importante en el proceso de aparición de las "hairy roots", es decir influye en la eficiencia de la infección.

- Los valores de cotransferencia en los sistemas binarios probados fueron muy similares y estuvieron muy cerca del 30%.

- Solo fué necesario el estímulo de luz para iniciar el proceso de organogénesis de las raíces transformadas de *Lotus*.

- Tanto las plantas regeneradas como las plantas compuestas de *Lotus*, son capaces de establecer simbiosis con *Rhizobium loti*; los nódulos formados son funcionales. No existe una diferencia significativa entre el número de nódulos y la actividad de nitrogenasa de ambos tipos de plantas.

- La actividad de GUS varió entre las distintas plantas transgénicas de *Lotus* obtenidas. Sin embargo, se pueden establecer diferencias entre la expresión constitutiva vs, la expresión nódulo específica.

- La actividad específica de GUS, dirigida por el promotor constitutivo, se presentó en los tres tejidos analizados. La actividad fue mayor en el nódulo con respecto a la raíz y la hoja, en este orden.

- Ninguna planta transgénica de *Lotus* derivada del plásmido con el promotor nódulo específico presentó actividad en la raíz o en la hoja y solamente presentó actividad en el nódulo.

- La actividad nódulo específica fue mucho mayor en plantas "compuestas" con respecto a las plantas transgénicas.

- La variedad de alfalfa Valenciana mostró una mejor capacidad para establecer simbiosis con *Rhizobium meliloti* 2011.

- Los porcentajes de infección en alfalfa, con la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* C58/pRi12 fueron bajos. Aunque se incrementaron al adicionar acetosiringona, lo que indica que los compuestos fenólicos pueden ser limitantes.

- Las plantas "compuestas" de alfalfa mostraron ser muy sensibles a las deficiencias de carbono o nitrógeno. Es necesario adicionar una fuente de carbono para aumentar el período de vida de estas plantas.

- Las plantas "compuestas" de alfalfa no presentaron capacidad para el establecimiento de la simbiosis, cuando estas fueron inoculadas con *Rhizobium meliloti* 2011.

## LITERATURA CITADA

- AGUILAR, O.M., KAPP, D. and PUHLER, A. 1985. Characterization of *Rhizobium meliloti* fixation gene (*fixF*) located near the common nodulation region. J. Bacteriology 164:245-254.
- APPLEBY, A. C. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:443-478.
- ARGUELLO-ASTORGA, G., GUEVARA, A. y HERRERA-ESTRELLA, L. 1991. Introducción a la Ingeniería Genética de Plantas. En Introducción a la Biología Molecular e Ingeniería Genética de Plantas. Rivera, R., Torres, I., Garzón J.A. y Herrera-Estrella L. Editores.
- BAUER, W.D. 1981. The infection of legumes by Rhizobia. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32:407-449.
- BEACH, K.H. and GRESSHOFF, P. 1988. Characterization and culture of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of forage legume. Plant Science 57:73-81.
- BENFEY, N.P. and CHUA, N. 1989. Regulated genes in transgenic plants. Science 244:174-181.
- BENFEY, N.P., REN, L. and CHUA, N. 1989. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. The EMBO Journal. 8(8):2195-2202.
- BERINGER, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84:188-198.
- BEVAN, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucl. Acids Res. 12:8711-8721.
- BINNS, A.N. and THOMASOHOW, M.F. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. Ann Rev. Microbiol.42:575-606.
- BHUVANESWARI, T.V., TURGEON, B.G. and BAUER, W.D. 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells. Plant Physiol. 66:1027-1031.
- BRAVO, A. and MORA, J. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. J. Bacteriology 170(2):980-984.
- BRIAN, L.A. and IYER, V.N. 1990. Fundamentals of gene transfer in plants.

- CAETANO-ANOLLES, G. and GRESSHOFF, P.M. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* 45:345-382.
- CAETANO-ANOLLES, G. and BAUER, W.D. 1988. Host-specificity mutants of *Rhizobium meliloti* have additive effects in situ on initiation of alfalfa nodules. *Planta* 181:109-116.
- CHABAUD, M., PASSIATORE, J.E. CANNON, F. and BECHANAN-WLLASTON, V. 1988. Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Plant Cell Reports* 7:512-516.
- CHRISTOPHER, D., EARL, B.S. and AUSUBEL, F.M. 1983. The genetic engineering of nitrogen fixation. *Nutrition Reviews* 41(1):1-6.
- CITOVSKY, V., McLEAN, G.B., GREENE, E., HOWARD, E., KULDAU, G., THORSTENSON, Y., ZAPAN, J. and ZAMBRYSKY, P. 1992. *Agrobacterium*-plant cell interaction: induction of vir gene and T-DNA transfer. In *Molecular Signals In Plant-Microbe Communications*. Verma, D.P. Editor. CRC Press. London.
- DAVID, C. and TEMPE, J. 1987. Segregation of T-DNA copies in the progeny of a regenerated from a mannopine-positive hairy root line. *Plant Molecular Biology*. 9:385-392.
- DE BLOCK, M., SCHELL, J. and VAN MONTAGU, M. 1985. Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal* 4(6):1367-1372.
- DEAK, M., KISS, G.B., KONCZ, C. and DUDITS, D. 1986. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 5:97-100.
- DEBELLE, F., ROSENBERG, C., VASSE, J., MAILLET, F., MARTINEZ, E., DENARIE, J. and TRUCHET, G. 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (*nod*) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriology* 168:1075-1086.
- DENARIE, J. and ROCHE, P. 1992. *Rhizobium* nodulation signals. In: *Molecular signals in Plant Microbe Communications*. Ed. Desh Pal S. Verma. C.R.C Press. U.S.A. Pp. 295-340.
- DITTA, G., STANFIELD, S., CORBIND. and HELINSKY, D.R. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:7347-7351.
- DJORDJEVIC, M.A., SCHFIELD, P.R. and ROLFE, B.G. 1985. Tn5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host-specific nodulation genes result in mutants with altered host range ability. *Mol. Gen. Genet.* 200:463-471.
- DJORDJEVIC, M.A., DEAN, W.G. and ROLFE, B.G. 1987. *RHIZOBIUM*-The refined parasite of legumes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:145-168.

- DOWNIE, J.A., KNIGHT, C.D., JOHNSTON, A.W.B. and ROSSEN, L. 1985. Identification of genes and gene products involved in nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum*. Mol. Gen. Genet. 198:255-262.
- EARL, C.D., RONSON, C.W. and AUSUBEL, F.M. 1987. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti fixA, fixB, fixC* and *fixX* genes. J. Bacteriology 169:1127-1136.
- FUENTES, M.S.I., SUAREZ, R., VILLEGAS, T., CASTRO, L. Y HERNANDEZ, G. 1993. Embryogenic response of Mexican alfalfa (*Medicago sativa*) varieties. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (en Prensa).
- GAMBORG, U.L., MILLER, R.A. and OJIMA, K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- GASSER, C.S. and FRALEY, R.T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. Science 244:1293-1299.
- GHEYSEN, G. and DEPICKER, A. 1987. DNA cloning: a practical approach. Ed. D. M. Glover. Press Oxford.
- HANSEN, J., JORGENSEN, J., STOUGAARD, J., MARCKER, K.A. 1989. Hairy roots a short cut to transgenic root nodules. Plant cell Rep. 8:12-15.
- HARTWIG, U.A., MAXWELL, C.A., JOSEPH, C.M. and PHILLIPS, D.A. 1990. Chrysoeriol and Luteolin released from alfalfa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 92:116-122.
- HIRSCH, A.M., BHUVANESWARI, T.V., TORREY, J.G. and BISSELING, T. 1989. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:1244-1248.
- HERRERA-ESTRELLA, L. DEPICKER, A., VAN MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1983. Expression of chimeric genes transferred into plant cell using a Ti-plasmid derived vector. Nature 303:209-213.
- HORVATH, B., KONDOROSI, E., JOHN, M., SCHMIDT, J., TOROK, I., GYORGYAL, Z., BARABAS, I., WEINEKE, U., SCHELL, J. and KONDOROSI, A. 1986. Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. Cell 46:335-346.
- HORVATH, B., BACHEM, C.W., SCHELL, J. and KONDOROSI, A. 1987. Host-specific nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal interacting with the *nodD* gene product. EMBO J. 6:841-848.



- HOOYKAS, P.J. and SCHILPEROORT, R.A.1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology. 19:15-38.
- JAN, J-P. and BISSELLING, T. 1990. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science 250:948-954.
- JEFFERSON R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol. Rep. 5:387-405.
- JEFFERSON, R.A., KAVANAGH, T. and BEVAN, M. 1987 GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6:3901-3907.
- JOHN, M., SCHMIDT, J., WIENEKE, U., KRUSSMANN, H.D. and SCHELL, J. 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of the *Rhizobium meliloti* common nodulation protein *nodC*. EMBO J. 7:583-588.
- KAPP, D., NIEHAUS, K., QUANDT, J., MULLER, P. and PUHLER, A. 1990. Cooperative action of *Rhizobium meliloti* nodulation and infection mutants during the process of forming mixed infected alfalfa nodules. Plant Cell 2:139-151.
- KLEE, J.H., YANOFSKY, F.M. and NESTER, W.E. 1985. vectors for transformation of higher plants. BIO/TECHNOLOGY 3:637-642.
- KLEE, H., HORSH, R. and ROGERS, S. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Ann. Rev. Plant Physiol. 38:467-486.
- LEON, P. y ORTIZ, E. 1990. Transformación vegetal.ICYT CONACYT, México, D.F. 12:73-77.
- LEROUGE, P., ROCHE, P., FAUCHER, C., MAILLET, F. and TRUCHET, G. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature 344:781-784.
- LONG, S.R. 1989. *Rhizobium*-Legume nodulation: life together in the underground. Cell 56:203-214.
- LOWRY, O.H., ROSEMBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- MANIATIS, T, FRITSCH, E.F. SAMBROOK J. 1982. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.

- MARTINEZ, E., ROMERO, D. and PALACIOS, R. 1990. The *Rhizobium* genome. Critical Review Plant Science 9(1):59-93.
- MEADE, H.M., LONG, S.R., RUVKUN, G.B., BROWN, S.E. and AUSUBEL, F.M. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J. Bacteriology 149:114-122.
- MERRICK, M. 1992. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G., Burris, R. and EVANS, H.J. (Eds.). Chapman and Hall, London.
- MULLIGAN, J.T. and LONG, S.R. 1985. Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:6609-6613.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-462.
- PETERS, N.K., FROST, J.W. and LONG, S.R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science 233:977-980.
- PETERS, N.K. and VERMA, D.P.S. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions 3(1):4-8.
- PETIT, A., STOUGAARD, J., KUBLE, A., MARCKER, K.A. and TEMPE, 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.
- PEZZOTTI, M., ARCIONI, S. and MARIOTTI, D. 1984. Plant regeneration from meshopyll root and cell suspension protoplasts of *Medicago sativa* cv. Adriana. Genet. Agr. 38:195-208.
- PHILLIPS, D.A. and TORREY, J.G. 1971. Studies on cytokinin production by *Rhizobium*. Plant Physiol. 49:11-15.
- POTRIKUS, I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. Biotechnology June 1990:535-542.
- ROCHA, S.M. y DE LAS PEÑAS, N.A. 1990. La fijación del Nitrógeno. ICYT CONACYT, México, D.F. 12:78-82.
- RODRIGUEZ-QUIÑONES, F., BANFALVI, Z., MURPHY, P. and KONDOROSI, A. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. Plant Mol. Biol. 8:61-75.
- ROLFE, B.G. and GRESSHOFF, P.M. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39:297-319.

- ROSENBERG, C., BOISTARD, P., DENARIE, J. and CASSE-DELBERT, F.L. 1981. Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184:326-333.
- SANCHEZ, F., PADILLA, E.J. PEREZ, H. and LARA, M. 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:507-528.
- SCHELL, J. 1987. Transgenic plants as tool to study the molecular organization of plant genes.
- SCHMIDT, J., WINGENDER, R., JOHN, M., WIENEKE, U. and SCHELL, J. 1988. *Rhizobium meliloti nodA* y *nodB* genes are involved in generating compounds that stimulate mitosis of the host plants cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8578-8582.
- SCHMIDT, J., JOHN, M., WIENEKE, U., KRUSSMANN, H.D. and SCHELL, J. 1986. Expression of the nodulation gene *nodA* in *Rhizobium meliloti* and localization of the gene product in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:9581-9585.  
*Science* 237:1175-1183.
- SHAHIN, E.A., SPIELMANN, A., SUKHAPINDA, K.L., SIMPSON, R.B. and YASHAR, M. 1986. Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell Biol. & Mol. Gen.* 26:1235-1239.
- SIMPSON, R., SPIELMANN, A., MARGOSSIAN, L. and McKNIGHT. 1986. A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology* 6:403-415.
- SPANO, L., MARIOTTI, D., PEZZOTTI, D.M. and ARCIONI, S. 1986. Hairy root transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L). *Theor. Mol. Appl. Genet.* 73:268-310.
- STACHELL, S.E., NESTER, E. and ZAMBRYSKY, P. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:379-383.
- STACHELL, S.E., TIMMERMAN, B. and ZAMBRYSKY, P. 1986. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cell. *Nature* 322:706-712.
- STOUGAARD, J., MARCKER, K.A., OTTEN, L., SCHELL, J. 1986. Nodule-specific expression of a chimeric soybean leghemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* 321:669-674.
- STOUGAARD, J., ABILDSTEN, D. and MARCKER, K.A. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* pRi TL-DNA segment as a gene vector system for transformation of plant. *Mol Gen Genet* 207:251-255.

--SUKHANPINDA, K., SPIVEY, R. and SHAHIN, E.A. 1987. **Ri-plasmid** as a helper for introducing vector DNA into alfalfa plants. *Plant Mol. Biol.* 8:209-216.

--TABAEIZADEH, Z. 1989. Genetic transformation of a pasture legume *Lotus corniculatus* L. (Birdfoot trefoil). *Biotech Letters* 11:411-416.

--TEMPE, J. and SCHELL, J. 1988. La manipulación de las plantas. *Mundo Científico* 7:792-801.

--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.

--TURGEON, B.G. and BAUER, W.D. 1985. Ultrastructure of infection thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* 163:328-349.

--VAN BRUSSEL, A.N.N., RECOURT, K., PEES, E., SPAINK, H.P., TAK, T., *et al.* 1990. A biovar-specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp *nigra*. *J. Bacteriology* 172:5394-5401.

--WHITE, F. 1989. Vectors for gene transfer in higher plants. In *Plant Biotechnology*. Kung, S. and Arntzen, Ch. Editors. Butterworths Publishers.

--WU, R. 1989. Methods for transforming plant cells. In *Plant Biotechnology*. Kung, S. and Arntzen, Ch. Editors. Butterworths Publishers.

--ZAMBRYSKI, P., JOOS, H., GENETELLO, C., LEEMANS, J., VAN MONTAGU, M., and 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