

123
21



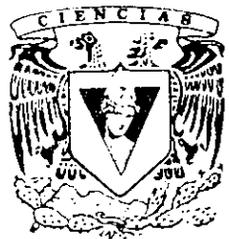
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA CLONA EN *Phaseolus vulgaris* L.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
OMAR ORTEGA VEGA

DIRECTOR DE TESIS: JORGE LUIS FOLCH MALLOL.



MEXICO, D. F.

1998.

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**

261621



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Aislamiento y caracterización de una clona en Phaseolus vulgaris L.

realizado por Omar Ortega Vega

con número de cuenta 8707834-1, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Jorge Luis Folch Mallol
Propietario M. en C. Juan Sainz Rojas
Propietario Dra. Clara Esquivel Huesca
Suplente Biól. Miguel Angel Meneses Pérez
Suplente M. en C. Rosa Elena Sarmiento Silva

[Folch]
[Sainz]
[Huesca]
[Meneses Pérez]
[Sarmiento Silva]
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi director de Tesis, el Dr. Jorge Luis Folch Mallol y a mi primer asesor el Dr. Marco Aurelio Pardo Galvan.

Deseo agradecer los comentarios, sugerencias y aportaciones que me proporcionaron los Doctores Alberto Camas y Jaime Enrique Padilla.

Un infinito agradecimiento a mis amigos Carlos Antonio Vital, Gabriel Sandoval, Jesús Herrera, José Martínez, Francisco Luis Aviña, Miguel Angel Ayala, Gerardo Manuel Parada y Larissa Ema Ventura.

Dedicatoria

Con todo el Amor y Cariño que nace de mi Alma a dos Maravillosas Personas que Dios me ha dado, les dedico mi Trabajo por siempre, a mi Madre Nancy Vega C. y a mi Esposa Elia Lujano de Ortega.

Por el Amor que sentimos, con la Esperanza de saberlos guiar, a mis dos Amados Hijos.

A mis Hermanos Zeus, Martín, Ulises, Dolores, Laura y Lourdes.

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Fijación de nitrógeno.....	3
La simbiosis <i>Rhizobium</i> -Leguminosa.....	5
Los genes de nodulación y la síntesis de lipo-oligosacáridos.....	11
Estructura química de los factores Nod.....	13
La función del gen <i>nodD</i> y la regulación de los genes <i>nod</i>	17
Papel de las hormonas en la organogénesis vegetal.....	18
Efecto de las hormonas y los factores Nod en la formación del nódulo.....	22
Objetivos	24
Material y metodología	25
Resultados	36
Discusión	50
Conclusión	55
Referencias	56

ABREVIATURAS ESCRITAS EN LA TESIS.

ABA	Acido absócsico
Amp	Ampicilina
bv.	Biovariedad
CHAPS	Cholamidopropil-dimetilamonio-1-propano sulfonato
C m	Cloramfenicol
cpm	Cuentas por minuto
c.s.p.	Cantidad suficiente para
2,4-D	2,4-Diclorofenoxiacético
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
FITA	Activación de la transcripción independiente de flavonoides
<i>fix</i>	Genes de fijación de nitrógeno
g	gramo(s)
GA	Acido giberélico
IAA	Acido indolacético
kb	Kilobases
L	Litro(s)
LB	Medio Luria
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MOPS	Acido 3-morfolinopropanosulfónico
NAA	Acido naftalenacético
ng	Nanogramos
<i>nif</i>	Genes de la fijación de nitrógeno
Nod	Proteínas codificadas por los genes <i>nod</i>
<i>nod</i>	Genes de nodulación
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramos(s)
pM	Picomolar
pSym	Plásmido simbiótico
Rif	Rifampicina
R	Resistencia
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
sp.	Especie(s)
Spc	Espectinomicina

TBE	Tris-borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TEMED	N,N,'N-tetrametiletilediamina
U	Unidades
v	Volumen
μCi	Microcuries
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar

Resumen

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los procesos de diferenciación celular en las plantas. Uno de estos procesos es estudiar la expresión de genes inducidos por factores Nod y auxinas, donde estos genes están involucrados en la organogénesis del nódulo.

Raíces de la planta de *Phaseolus vulgaris* L. fueron cortadas al quinto día e incubadas en una solución que disminuye la poza endógena de auxinas (solución desauxinante); posteriormente, cada muestra fue vaciada a su respectivo tratamiento los cuales fueron los siguientes: factores Nod en extracto butanólico de la cepa *R. tropici* CIAT899, IAA y NAA. Para la muestra control se usó únicamente solución desauxinante. Mediante la técnica de despliegue diferencial (Differential Display) a las cuatro muestras de raíces tratadas se les extrajo el RNA y se obtuvo la síntesis de cDNA utilizando el oligo Poli-T₁₁CA y la enzima reverso transcriptasa; El cDNA fue amplificado mediante la técnica de PCR utilizando los oligos OPR₁ y PoliT₁₁CA marcados radiactivamente para después ser corrido en un gel de secuencia. De aquí obtuvimos las secuencias T₁₁CA R₁O₁ de 170 pb y la T₁₁CA R₁O₂ de 200 pb que se expresan por factores Nod y auxinas, estando ausentes en el control. Estas secuencias fueron utilizadas como sondas para comprobar la inducción de su transcrito mediante pruebas de tipo northern. Sólo la secuencia T₁₁CA R₁O₁ hibridó con su mRNA homólogo de muestras de raíces tratadas con factores Nod y auxinas, al cual llamamos R₁O₁. Otros experimentos realizados donde exploramos su inducción temporal, mejorando las condiciones de incubación y utilizando la cepa control *R. tropici* RSP900 demostraron mediante pruebas tipo northern que el transcrito R₁O₁ mantiene en un mínimo su expresión en muestras de raíces tratadas con solución desauxinante y muestras tratadas con el extracto de la cepa RSP900, mientras que con auxinas, éstas inducen el transcrito y con factores Nod lo mantienen expresado por tiempo prolongado. La expresión mínima del transcrito R₁O₁ que se observa en ciertos periodos de tiempo en las muestras controles podría ser debido a una hibridación cruzada. Se comprobó que nuestra solución desauxinante funcionaba de manera óptima disminuyendo la poza endógena de auxinas de las raíces ya que se llevó a cabo un experimento tipo northern usando la secuencia GH3 inducible por auxinas, demostrando que en las muestras controles usando solución desauxinante y factores Nod no se observa ningún transcrito homólogo a dicha secuencia, mientras que en muestras tratadas con auxinas se observa la expresión de un transcrito homólogo al detectado en hipocotilo de soya, pero diferente al R₁O₁ estudiado en este laboratorio.

Introducción.

El nitrógeno es un elemento importante para los seres vivos ya que forma parte de la estructura de moléculas tales como ácidos nucleicos, proteínas con algunas de ellas con funcionamiento enzimático, aminoácidos, cofactores, etc.

La fijación de nitrógeno es un proceso natural exclusivo de microorganismos procariontes, que consiste en la reducción de nitrógeno molecular (N_2) a amonio (NH_3). Aunque el nitrógeno molecular es abundante en la atmósfera, es relativamente inerte para la mayoría de los organismos; éstos obtienen el nitrógeno en formas combinadas como nitratos, amonio y algunas moléculas más complejas como los aminoácidos; sin embargo, estas moléculas son muy escasas en el agua y la superficie terrestre (Lehninger, 1982). Actualmente uno de los métodos para abastecer de nitrógeno a las plantas es el uso de fertilizantes, sin embargo estos presentan varios problemas: en primer lugar, su costo de producción es muy elevado ya que su síntesis requiere de una gran cantidad de energía, suministrada principalmente por derivados del petróleo; por otro lado, los fertilizantes nitrogenados son muy solubles en agua, por lo que se lavan fácilmente del suelo y es necesario aplicarlos varias veces a lo largo de la cosecha. Esta misma característica de solubilidad hace que estos compuestos contaminen el manto freático y desemboquen en ríos, mares y lagunas alterando el equilibrio ecológico de los ecosistemas (Delwiche C.C., 1970; Delwiche C.C., 1981).

Una posible alternativa al uso de fertilizantes químicos nitrogenados que podría mejorar el suministro de nitrógeno a las plantas a un bajo costo es mediante la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa. Sin embargo el problema estriba en el rendimiento de la cosecha ya que suele ser mayor cuando se aplican fertilizantes químicos, y por otro lado, las cepas de microorganismos seleccionadas, al agregarlas al campo, son desplazadas por las poblaciones autóctonas que están mejor adaptadas a las condiciones del suelo. Hasta la fecha, los mejores resultados se han obtenido en cultivos de caña de azúcar aplicando mezclas de fertilizantes nitrogenados con bacterias del género *Azotobacter* (J. Caballero, comunicación personal).

La simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* de la familia Rhizobiaceae da como resultado la formación de un órgano específico llamado nódulo, donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno. De este modo la planta recibe el amonio producto de la

reducción del nitrógeno molecular y las bacterias reciben fotosintato producto de la fijación de bióxido de carbono; estos géneros bacterianos son incapaces de fijar nitrógeno en vida libre, en contraste con otros géneros como *Azospirillum*, *Azotobacter* o *Klebsiella* que fijan nitrógeno en vida libre (Young y Johnston, 1989).

Fijación de nitrógeno.

Para producir amonio a partir de nitrógeno molecular, los bacteroides necesitan sintetizar la enzima nitrogenasa; esta enzima lleva a cabo la reducción de nitrógeno molecular y con el uso concomitante de 12 ATP, Mg^{2+} y ferredoxina reduce esta molécula binaria a dos moléculas de NH_3 , más ADP y H_2 . Sin embargo, esta reacción se inhibe ante O_2 , ADP y NH_3 , por lo cual la planta lleva a cabo una serie de procesos metabólicos para contrarrestar estos inhibidores; por ejemplo, sintetiza leghemoglobina para controlar el suministro de O_2 a los bacteroides (Layzell y Hunt, 1990).

La base genética para la fijación de nitrógeno comenzó a estudiarse en *Klebsiella pneumoniae*; ahora una amplia gama de genes involucrados en la fijación se han encontrado en las especies de Rhizobia. Existen en *Rhizobium* genes homólogos a aquellos de *Klebsiella* que han sido denominados genes *nif*, pero algunos genes involucrados en la fijación de nitrógeno que sólo se encuentran en *Rhizobium* han sido denominados genes *fix*. La presencia de los genes *fix* es congruente con las condiciones ambientales especiales en las cuales se lleva cabo la fijación de nitrógeno en *Rhizobium*. Esto sugiere que la ruta metabólica de la fijación de nitrógeno en simbiosis es distinta de aquella en vida libre.

Algunos genes que participan en la fijación de nitrógeno y se encuentran en el plásmido simbiótico o en el cromosoma de las especies de Rhizobia, dispuestos en diferentes unidades transcripcionales se muestran en la tabla I.

Tabla I. Principales genes *nif* y *fix* involucrados en la fijación de nitrógeno (Fischer, 1994).

<i>nif A</i>	Activador transcripcional de genes <i>nif</i> y <i>fix</i> , incluidos los genes <i>nif DKH</i> .
<i>nif B, N, E</i>	Síntesis del cofactor hierro-molibdeno de la nitrogenasa.
<i>nif F, J, G</i>	Transporte de electrones en el complejo nitrogenasa.
<i>nif DKH</i>	Genes estructurales que codifican para las subunidades del complejo de la enzima nitrogenasa.
<i>nif L</i>	Reduce la actividad de <i>nif A</i> en presencia de oxígeno y nitrógeno fijado.
<i>fix I</i>	Subunidad catalítica de una bomba de cationes.
<i>fix P</i>	Homólogo al citocromo C.
<i>fix ABCK</i>	Transporte de electrones específicos de la nitrogenasa.
<i>fix J, L</i>	Genes reguladores de <i>nif A</i> y <i>fix K</i> .
<i>fix NOPQ</i>	Sus productos están asociados a membrana.
<i>fix GHIS</i>	Sus productos están asociados a membrana.
<i>fix N</i>	Regulador de las concentraciones de O ₂ .
<i>fix G</i>	Gen involucrado en el transporte de electrones.
<i>fix H</i>	Homólogo a una ferredoxina.
<i>fix K</i>	Gen regulador que controla la expresión de genes que se activan en condiciones anaeróbicas.

Además de la proteína Nif A, que activa la transcripción de los genes estructurales para la fijación de nitrógeno, existen otras proteínas reguladoras como NtrC y DctD que activan la transcripción de genes involucrados en la asimilación de nitrógeno en *Rhizobium* (Ronson et al., 1987). Asimismo, la concentración de oxígeno es una de las señales principales para la activación y regulación de estos genes simbióticos dentro del nódulo; sin embargo hay otras señales que son necesarias para que la fijación simbiótica de nitrógeno sea efectiva. Estas y otras evidencias indican que existe una serie de señales moleculares que están involucradas en la regulación de genes para la fijación de nitrógeno.

La Simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa.

Dentro de la gran cantidad de microorganismos fijadores de nitrógeno, algunos miembros de la familia *Rhizobiaceae* tienen especial interés ya que forman asociaciones simbióticas con plantas leguminosas para el consumo humano. Además, la cantidad de nitrógeno molecular incorporado a la planta como resultado de esta simbiosis, se ha calculado en un tercio del total del nitrógeno requerido por la agricultura mundial y equivale a la producción de fertilizantes nitrogenados producidos por año (Economou y Downie, 1992). Esta serie de datos, ha llevado a muchos grupos de varios países a un intenso proceso de investigación, de modo que esta simbiosis es una de las interacciones planta-bacteria mejor conocidas. En la tabla II se muestra una variedad de géneros bacterianos de la familia *Rhizobiaceae* que pueden nodular uno o varios hospederos.

Una de las características importantes de estas asociaciones simbióticas es que son específicas y sólo ciertas especies de *Rhizobium* pueden nodular un amplio número de géneros distintos. Así, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* es una bacteria capaz de establecer simbiosis con plantas del género *Trifolium* pero es incapaz de nodular otras plantas leguminosas como *Phaseolus* o *Medicago*; *Rhizobium meliloti* es capaz de nodular plantas de los géneros *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella*, pero no establece asociaciones compatibles con otros géneros de leguminosas; *Rhizobium tropici* CIAT899 y *R. sp.* NGR234 son especies con un amplio espectro de nodulación, donde esta última cepa es capaz de nodular más de 70 especies distintas de leguminosas. Dos peculiaridades dentro de esta simbiosis es que los nódulos que se forman en los árboles leñosos de *Casuarina*, *Alnus* y *Mirya* son modificaciones de raíces laterales y sólo una planta no leguminosa, *Parasponia*, es capaz de ser nodulada por *Rhizobium* NGR234 (Dénarié et al., 1992).

Tabla II. Bacterias que se asocian simbióticamente con una o varias plantas para la formación de nódulos (Heidstra, 1996; Spaink, 1996).

Género bacteriano.	Planta hospedera.
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Vicia</i> (haba), <i>Pisum sativum</i> (chícharo), <i>Lathyrus</i> (chícharo de olor), <i>Lens</i> (lenteja).
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (trébol).
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol).
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Melilotus</i> , <i>Medicago sativa</i> (alfalfa), <i>Trigonella</i> .
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> , <i>Anthyllis</i> .
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> .
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	<i>Laucaena</i> (guaje), <i>Macroptilium</i> (siratro), <i>Medicago</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> .
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i> (soya), <i>Vigna unguiculata</i> (cowpea).
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Vigna unguiculata</i> .
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Lupinus</i> (altramuz), <i>Ornithopus</i> .
<i>Rhizobium</i> GRH2	<i>Acacia</i> , <i>Phaseolus</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i> .
<i>Frankia sp.</i>	<i>Alnus</i> , <i>Casuarina</i> , <i>Mirya</i> .
<i>Rhizobium sp.</i> NGR234 y MPIK	<i>Parasponia andersonii</i> , <i>Vigna unguicula</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> .

Para la formación de los nódulos se requiere de un intercambio de señales así como la intervención de un gran número de genes tanto de la planta como de las bacterias. El proceso inicia cuando las bacterias reconocen los flavonoides secretados por las raíces de la planta. Los flavonoides como naringenina, apigenina, 7-hidroxi-flavona son moléculas heterocíclicas que contienen O₂ con un anillo 1,3-difenilpropano; su composición y concentración están reguladas por el ambiente y por interacciones biológicas (Dénarié et al., 1992). Además de tener un papel como intermediarios metabólicos de la síntesis de fitoalexinas y compuestos fenólicos como parte del sistema de defensa de la planta e inhibidores del transporte de auxinas, estos flavonoides inducen la expresión de los genes *nod* para la síntesis de lipooligosacáridos, por parte de las bacterias. A su vez, estos compuestos son reconocidos por la planta y disparan la formación del nódulo. Una vez ocurrido el reconocimiento bacteria-planta a través de este intercambio de señales químicas entre los dos simbioses, las células bacterianas se adhieren a la punta de los pelos radicales. El proceso de adhesión ocurre en dos fases; inicialmente se unen débilmente a la raíz y después se da una adherencia firme y la acumulación de células bacterianas a la punta del pelo radical. La primera fase de este proceso está mediada por una proteína de superficie bacteriana que une calcio llamada ricadhesina; en la segunda fase de adhesión, intervienen fibrillas de celulosa de la bacteria. Por parte de la planta, intervienen unas proteínas llamadas lectinas, que son polipéptidos capaces de unir polisacáridos extracelulares de *Rhizobium* (Kijne, 1991), aunque también hay cambios en la membrana vegetal, lignificación, síntesis de fitoalexinas de bajo peso molecular, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, enzimas parecidas a peroxidasas y quitinasas como una respuesta para contrarrestar la invasión de las bacterias (Smit 1987, 1992; Spaink, 1996). Algunos de los pelos radicales en donde se han adherido las bacterias sufren una serie de cambios morfológicos, dirigidos probablemente por el citoesqueleto de la célula vegetal. Estos cambios incluyen curvatura, deformación y ramificación (Smit et al., 1987); la pared se degrada y la membrana vegetal se invagina formando el hilo de infección, extendiéndose entre las células de la raíz hasta llegar a la corteza donde las bacterias una vez que se han multiplicado dentro del hilo de infección, son liberadas al interior del citoplasma de algunas células corticales que se encontraban en división, y son rodeadas por una membrana de origen vegetal conocida como membrana peribacteroidal (Economou y Downie, 1992; Heidstra et al., 1996). Una vez dentro de la membrana peribacteroidal, las bacterias se diferencian en bacteroides y se da paso a la formación del nódulo y a la fijación de nitrógeno. En la figura 1 se muestran los diferentes pasos para la formación del nódulo.

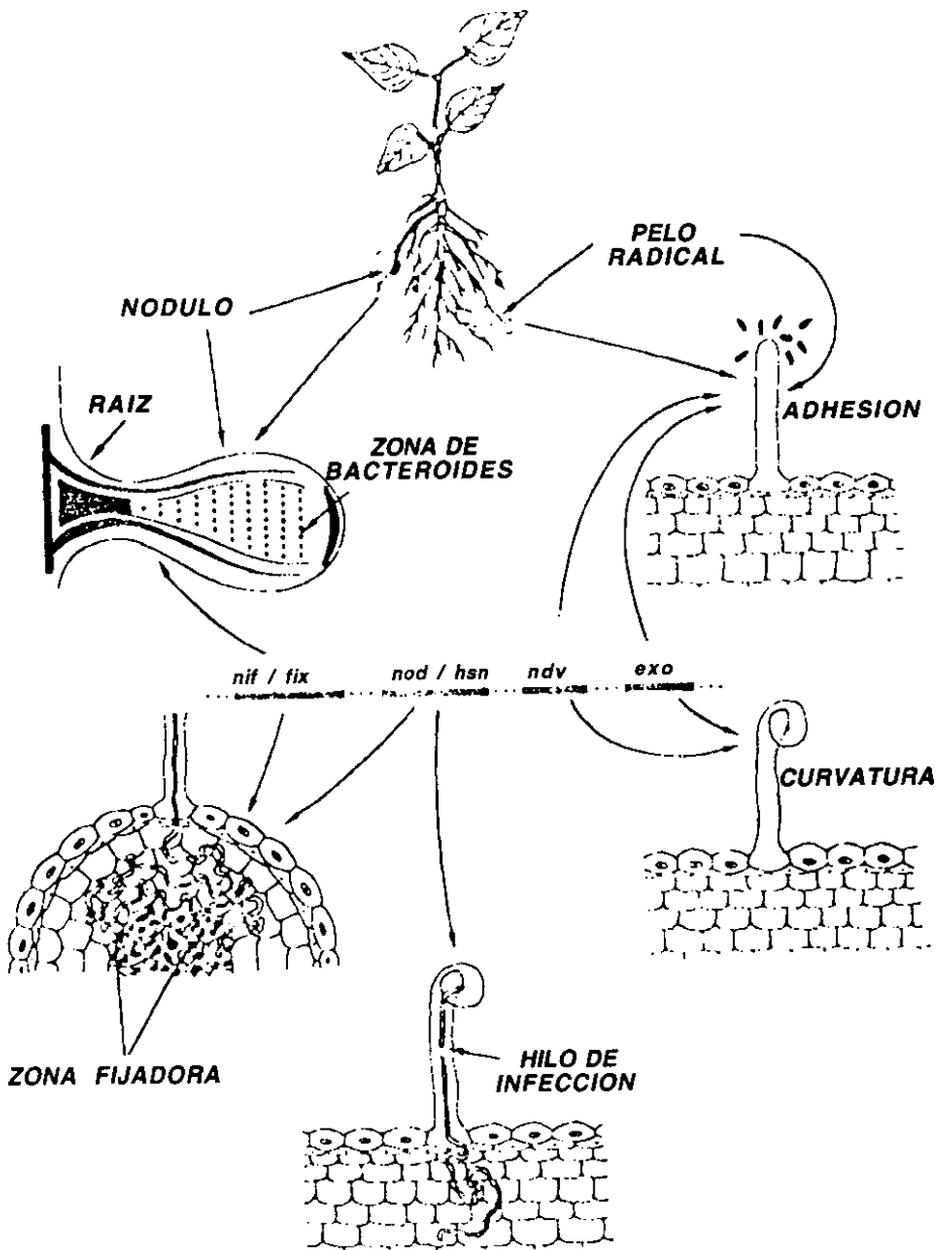


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes pasos en el proceso de nodulación.

En el nódulo maduro encontramos haces vasculares y dos tipos de células: infectadas que son aquellas que contienen a los bacteroides y células no infectadas. La reducción del nitrógeno molecular para la síntesis de amonio se lleva a cabo en células infectadas y su utilización para la síntesis de aminoácidos esenciales como el glutamato y glutamina se propone que podría llevarse a cabo en los dos tipos celulares. A partir de estos dos aminoácidos esenciales se sintetizan moléculas como aminoácidos, nucleótidos, purinas, pirimidinas, cofactores, aminas, ureídos, entre otros. De estos compuestos nitrogenados sólo se transporta ureídos o aminas al resto de los tejidos vegetales.

La organogénesis del primordio nodular puede dar origen al desarrollo de un nódulo determinado o un indeterminado; por ejemplo, especies leguminosas de clima tropical como soya, haba, cowpea y frijol desarrollan un nódulo determinado el cual es una estructura redonda que no contiene actividad meristemática, mientras que especies de clima templado como trébol, chícharo y alfalfa el primordio nodular conduce a la formación de un meristemo persistente que crece durante el proceso de infección resultando un nódulo alargado, denominándose nódulo indeterminado (Heidstra, 1996).

A lo largo de la formación del hilo de infección y en la liberación de las células bacterianas dentro de las células corticales, los exopolisacáridos de *Rhizobium* juegan un papel fundamental, ya que se ha demostrado que mutantes *exo*⁻ de varias especies de *Rhizobium* son incapaces de formar nódulos (Leigh et al., 1985). Probablemente los exopolisacáridos de *Rhizobium* enmascaren a las bacterias, permitiéndoles escapar al sistema de defensa de la planta.

Durante este proceso las células vegetales también inducen una serie de genes que se expresan en etapas tempranas y en etapas tardías del desarrollo nodular; estos genes han sido denominados nodulinas. Los genes de nodulinas que se expresan en etapas tempranas se encuentran involucrados en el proceso de infección y la morfogénesis del nódulo, algunos de ellos son: ENOD12 que codifica para una proteína rica en hidroxiprolina y es similar a proteínas que han sido identificadas como componentes de paredes celulares, en soya (Scheres et al., 1990; Nap & Bisseling, 1990). Esta proteína se encuentra en el hilo de infección, así como en células no infectadas que ayudan a la formación del hilo de infección y en el primordio nodular. En alfalfa se ha aislado una proteína similar a ENOD12, llamada MsENOD12A que se expresa en una región del nódulo llamada zona de invasión. La proteína ENOD5 además de ser rica en prolina también contiene alanina, glicina y serina, se

propone que es una proteína de pared celular, aunque también se cree que se encuentra en la membrana plasmática del hilo de infección y en las membranas peribacteroides (Franssen et al., 1992). La nodulina llamada ENOD2 es una proteína rica en hidroxiprolina, probablemente de pared celular (van de Wiel et al., 1990). GmENOD2 y GmENOD13 han sido detectadas en células del parénquima, en el nódulo; parece ser que GmENOD13 es un componente de pared celular (Franssen et al., 1992). Las nodulinas ENOD3, ENOD14 y ENOD6 han sido localizadas cerca de una región llamada zona de fijación que se encuentra en el nódulo, pero su función se desconoce. Por otra parte, los genes de nodulinas que se expresan en etapas tardías están involucrados en la asimilación de amonio, carbono y oxígeno; entre éstos se encuentran: la leghemoglobina que controla los niveles de oxígeno que llegan a los bacteroides (Appleby et al., 1988). La uricasa convierte la xantina, formada a través del metabolismo de las purinas, a ureídos (Nguyen et al., 1985). La sacarosa sintetasa transporta moléculas de carbono que son requeridas para efectuarse la fijación de N₂ (Thummler y Vema, 1987). La glutamino sintetasa juega un papel importante en la asimilación del amonio (Cullimore et al., 1984). Muchos otros genes de nodulinas han sido clonados, pero su función, localización y regulación no han sido determinados.

Los genes de nodulación y la síntesis de lipo-oligosacáridos.

Los genes de nodulación en *Rhizobia* llamados *nod*, *not* y *noe* (Spaink, 1995) codifican las proteínas que sintetizan y transportan lipo-oligosacáridos (factores Nod), compuestos que están involucrados en los eventos tempranos del proceso de infección, nodulación y la organogénesis del nódulo. La mayoría de los genes de nodulación se encuentran en megaplásmidos llamados pSym (plásmido simbiótico), pero en algunos géneros como *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* se encuentran en el cromosoma (Johnston et al., 1978; Nuti et al., 1979; Van Den Eede et al., 1987). Casi todos están incluidos en diversos operones que comparten características comunes del promotor y están regulados por un activador transcripcional llamado *nodD* vía unión a unas secuencias consenso llamadas *cajas nod*. En la figura 2 se muestra la organización genética de varios operones *nod* para diversas especies de *Rhizobia*.

Los factores Nod son lipo-oligosacáridos compuestos de un esqueleto de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina variando en su longitud de tres a seis unidades de glucosamina, con una molécula de ácido graso unido al nitrógeno en el extremo no reductor, y una variedad de grupos funcionales que tienen funciones específicas en la nodulación (V. figura 3). En algunos casos se ha podido inducir la formación de nódulos completos en plantas estériles de alfalfa con sólo añadir estos compuestos a muy bajas concentraciones (Lerouge et al., 1990); así también la concentración de los factores Nod podría ser específica para ciertos estadios en la formación del nódulo ya que se ha demostrado que una concentración de 10^{-11} M provoca la deformación de los pelos radicales mientras que una concentración de 10^{-7} M estimula la división de las células corticales, en alfalfa (Hirsch, 1992). Dado que la concentración a la cual actúan es extremadamente baja, se postula la existencia de receptores de alta afinidad en la planta. La evidencia de que existen distintos requerimientos estructurales del factor para distintas respuestas en la planta también hace pensar en que existan varios tipos de receptores con diferentes afinidades para distintas partes del lipo-oligosacárido y/o distinta localización celular. Se está explorando la posibilidad de que los factores Nod producidos por *Rhizobium* sean una mezcla de señales endógenas de la planta. Existen varias evidencias para considerar esta posibilidad; en primer lugar, pese que los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* son genéticamente lejanos, todas las especies analizadas producen factores de nodulación similares. En segundo lugar, el hecho de que los genes *nod ABC* (ver más adelante) sean requeridos para nodular a la planta ulmácea *Parasponia* indica que los factores Nod son capaces de inducir

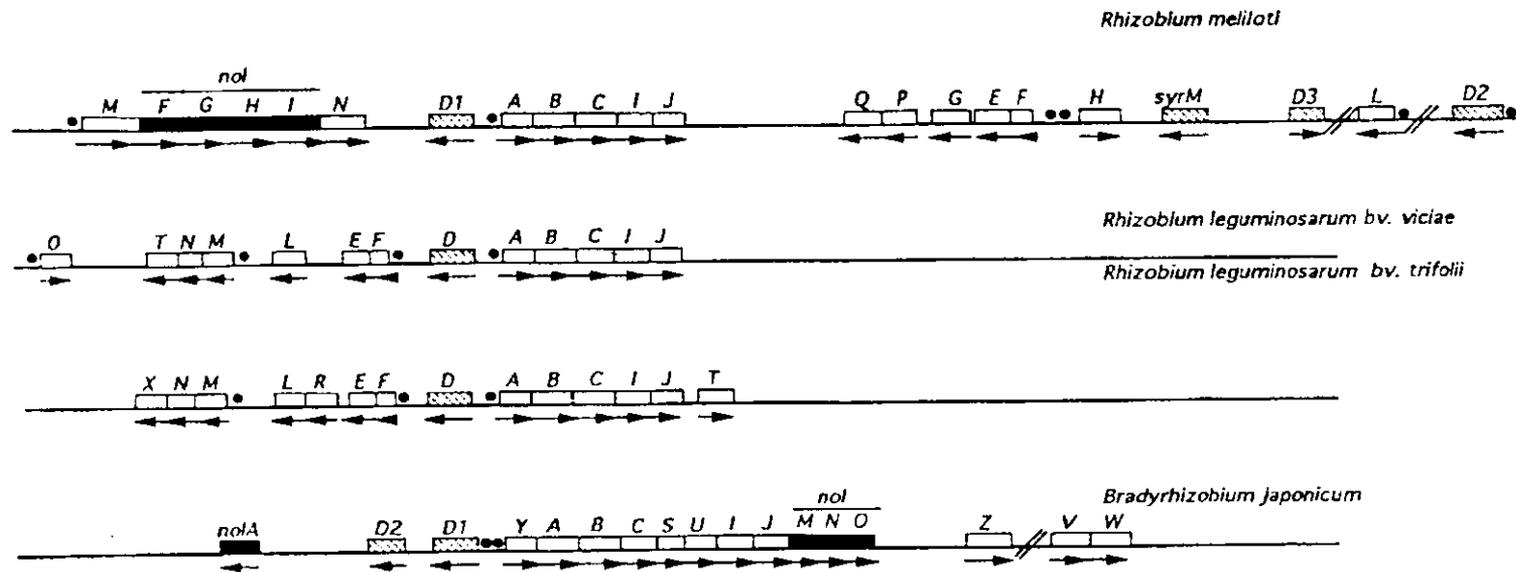


Figura 2. Organización genética de los operones *nod* en diversas especies de Rhizobia.

respuestas en plantas no leguminosas, lo que sugiere un mecanismo más general de desarrollo ontogénico (deJong et al., 1993).

La función de los factores Nod es inducir varias respuestas para la formación del nódulo, entre ellas se encuentran la despolarización del potencial de membrana; modulación de protones y flujo de calcio; deformación del pelo radical; expresión de genes de nodulinas tempranas tales como ENOD5, ENOD8, ENOD12, ENOD40, ENOD PRP4; inducción de genes para el ciclo celular; formación del primordio nodular e inducción de la expresión de promotores que responden a auxinas (Spaink, 1996; Heidstra et al., 1996). Actualmente se están llevando a cabo estudios para determinar el mecanismo biológico por medio del cual estos factores ejercen su actividad en la planta.

Estructura química de los factores Nod.

Existen diferencias en la estructura química de los factores Nod dependiendo de la especie de la cual provengan, lo que sugiere que este podría ser parte de un mecanismo para la especificidad de la simbiosis. En la tabla III se muestran diferentes arreglos estructurales que presentan varios factores Nod sintetizados por distintas especies de *Rhizobia* y en la tabla IV se muestra la función de las proteínas Nod para la síntesis de los factores de nodulación. Así, los factores Nod de *R. tropici* y *R. meliloti* están *o*-sulfatados mientras que las variedades de *R. leguminosarum* no lo están, además *R. meliloti* tiene cromosomas homólogos de los genes *nodPQ*. En algunas especies como *R. l. bv. viciae*, *R. meliloti* y *R. l. bv. trifolii* la estructura de los factores Nod presenta una alta cantidad de ácidos grasos insaturados los cuales tienen un papel esencial en la nodulación, ya que se ha demostrado que si existe alguna modificación en la hidrogenación de éstos, la actividad biológica de los factores Nod disminuye considerablemente (Spaink, 1991; Truchet, 1991; Bloemberg et al., 1995). Además de ser importantes los genes *nodE,F* en *R. l. bv. viciae* para nodular a su hospedero habitual (veza), el gen *nodL* también lo es. Otras especies como *R. tropici* puede sintetizar factores Nod metilados, sulfatados o que contengan ambos grupos funcionales así como varios ácidos grasos diferentes (Folch et al., 1994).

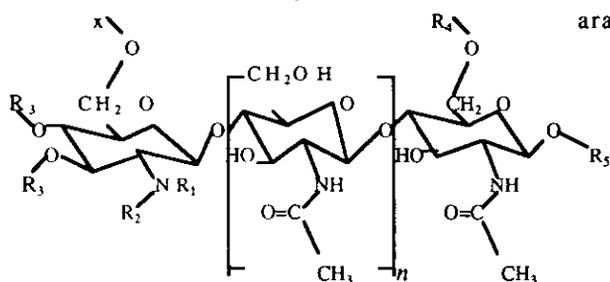
Las *o*-substituciones de grupos funcionales de los factores Nod que se han estudiado en laboratorio han mostrado tener un papel determinante en su actividad biológica ya que por ejemplo, en *R. meliloti* el grupo sulfato y el grupo acetil son esenciales para la actividad del factor; por un lado, mutantes de *nodH* en *R. meliloti* pierden la capacidad de nodular a su hospedero habitual (alfalfa), pero ahora

adquieren la capacidad para nodular veza (Leuroge et al., 1990; Roche et al., 1991) y por otra parte, en mutantes en el gen *nodL* se ha observado una reducción considerable en la nodulación. Existe un gen específico en *R. l. bv. viciae* que no está presente en sus demás variedades y que aparentemente no interviene en la modificación directa del factor de nodulación. Este es el gen *nodO*, que es capaz de complementar la incapacidad de nodular veza de cepas mutantes de *nodF,E* de *R. l. bv. viciae*, aunque no está claro el porqué lo hace (Downie et al., 1992). Cuando los factores de *R. meliloti* se añaden a raíces de alfalfa, se ha observado la formación de meristemas que dan lugar a nódulos con idéntica anatomía y ontogenia que aquellos inducidos por la bacteria (Truchet et al., 1991). Estos datos podrían sugerir que la planta contiene toda la información genética necesaria para el desarrollo del nódulo.

Otro factor importante en la actividad biológica de estos compuestos es la longitud del esqueleto de quitina, ya que se ha observado que dentro de los factores producidos por *R. meliloti*, el tetrámero es más activo que los trímeros o los pentámeros (Schultze et al., 1992).

Tabla III. Estructura de los factores Nod sintetizados por algunas especies de Rhizobia (Spaink et al., 1994; Mylona et al., 1995).

Especie	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	unidades glucosamina
<i>R. l.</i>						
bv. <i>viciae</i>	H	C18:1, C18:4	COCH ₃	H	H	2,3
bv. <i>trifolii</i>	H	C18:1, C18:3 C20:1, C20:2 C20:3, C20:4	COCH ₃	H	H	3,4,5
<i>R. meliloti</i>	H	C16:2, C16:3	COCH ₃	SO ₃ H	H	1,2,3
<i>R. loti</i>	CH ₃	C18:0, C18:1	carbamil	4- <i>o</i> -acetil fucosil	H	3
<i>R. tropici</i>	CH ₃	C16:0, C16:1 C16:2, C18:1 C18:2	H	SO ₃ H	2- <i>o</i> - manosil	3,4
<i>R. fredii</i>	H	C18:1	H	2- <i>o</i> -metil fucosil	H	1,2,3
<i>B. japonicum</i>	H	C16:0, C16:1 C18:1	COCH ₃	2- <i>o</i> -metil fucosil	H	3
<i>A. caulinodans</i>		CH ₃ C18:1	H	carbamil-D- arabinosil	H	2,3



R₁ = Hidrógeno o Metil
R₂ = Acido graso
R₃ = Hidrógeno o Carbamil
R₄ = Sulfato o Metilfucosa
R₅ = Hidrógeno, Glicerol o Manosa
n = Unidades de Glucosamina
x = *o*-Acetil

Figura 3

Tabla IV. Función de las proteínas Nod y Nol para la síntesis de los factores Nod (Heidstra y Bisseling, 1996; Spaink, 1994; Megías et al, 1993; Hirsch, 1992).

Proteínas Nod	Función de las proteínas Nod
Syr M	Homóloga a Nod D, actúa como reguladora, sólo se encuentra en <i>Rhizobium meliloti</i> .
Nod D	Regulador transcripcional.
Nod A	Aciltransferasa, acila el esqueleto de N-acetilglucosamina
Nod B	Desacetilasa, desacetila el esqueleto de N-acetilglucosamina, para que un lípido sea añadido.
Nod C	N-acetilglucosamina transferasa, une unidades de β -1,4-acetilglucosamina.
Nod M	Glucosamina sintetasa, cataliza la transferencia de un grupo amino de glutamato a fructosa 6-fosfato.
Nod I, Nod J	Excretan el lipo-oligosacárido de la célula.
Nod E, Nod F	β -cetoacil sintasa, proteínas portadoras del grupo acil, sintetizan ácidos grasos.
Nod G	Cetoacilreductasa.
Nod H	Sulfotransferasa, transfiere el grupo sulfato al extremo reductor.
Nod P	ATP sulfurilasa, proteína intermediaria para la síntesis del grupo sulfato.
Nod Q	Intermediario de la sulfotransferasa, conduce la producción del donador SO_4 tomado de 3'-fosfoadenosín 5-fosfosulfato.
Nod L	<i>o</i> -acetiltransferasa.
Nod S	Metiltransferasa, incorpora un grupo metil.
Nod O	Homóloga a una α -hemolisina de <i>E. coli</i> .
Nod T	Proteína que ayuda a las proteínas Nod I y Nod J.
Nod V	Activador transcripcional de dos componentes.
Nod U	Carbamoiltransferasa.
Nod X	Acetiltransferasa.
Nod Z	Fucosiltransferasa, incorpora una molécula de arabinosa o fucosa.
Nol O	Fucosiltransferasa.
Nol K	Azúcar-epimerasa.
Nol R	Represor de la caja de nodulación.

La función del gen *nodD* y la regulación de los genes *nod*.

Los genes de nodulación han sido clasificados en tres grupos; por un lado está la familia de genes regulatorios *nodD*, de los cuales existen varios alelos y algunas especies tienen múltiples copias de ellos. Por otro lado están los genes *nod* comunes que se han denominado así porque son funcionalmente intercambiables entre distintas especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*; por último, los genes *nod* específicos cuya función determina la especificidad de la simbiosis (Kondorosi et al., 1984). V. tabla IV.

La existencia de ciertos genes *nod* y su activación en algunas especies y en otras no da como resultado una especificidad en la simbiosis (Megfás et al., 1993). El gen *nodD* se ha encontrado en todas las especies de Rhizobia; en algunas especies el gen se encuentra en una sola copia mientras que en otras especies se han encontrado hasta cuatro copias (Rodríguez Quiñones et al., 1987). Existe una proteína llamada SyrM que muestra homología con la proteína NodD y está involucrada en su regulación (Long et al., 1989). La proteína NodD es un activador transcripcional de los genes *nod*, *nol* y *noe* y muestra diferentes afinidades por flavonoides, dependiendo de la especie de la cual provenga ya que diferentes especies de plantas excretan distintas combinaciones de flavonoides y sólo aquella proteína NodD que reconozca ciertos flavonoides podrá activar la transcripción de los genes de nodulación y permitir a la bacteria nodular esa planta determinada (Györgypal et al., 1988; Spaink et al., 1989). En su región amino terminal se encuentra un dominio de unión a DNA y una secuencia llamada módulo receptor que se ha postulado como un dominio de interacción proteína-proteína. El extremo carboxilo no está tan conservado entre las diferentes especies de *Rhizobium*, por lo que se ha postulado que esta región de la proteína es la encargada de reconocer a los flavonoides. Se ha obtenido una mutante de *nodD* (*nodD* FITA) que ha perdido la regulación por flavonoides por la cual activa constitutivamente la transcripción de los genes *nod* y *nol*. La mutación se encuentra en el extremo carboxilo terminal favoreciendo la hipótesis de que es en este dominio de la proteína donde interactúan los flavonoides (Spaink et al., 1989). Algunos compuestos exudados por la planta e inclusive algunas proteínas regulatorias como NodR, SyrM y la misma NodD regulan al gen *nodD* (Davis y Johnston, 1990; Maillet et al., 1990). La mayoría de los operones *nod* tienen una secuencia conservada de aproximadamente 50 pb situada corriente arriba del inicio de la transcripción, llamada caja de nodulación. La proteína NodD se une a esta secuencia conservada para activar la transcripción de los genes *nod* (Long, 1992).

Por otra parte, los genes *nodABCIIJ* se han denominado genes *nod* comunes; estos genes son funcionalmente intercambiables entre diversas especies de Rhizobia. Los genes *nodABC* son esenciales para el proceso de nodulación, ya que cualquier mutación en ellos bloquea la síntesis del factor de nodulación; pero mutaciones en los genes *nodIIJ* sólo provocan un fenotipo de retraso en la nodulación (Evans y Downie, 1986; Vázquez, 1992). Los genes *nod* específicos no se encuentran presentes en todas las especies de Rhizobia, en contraste con los genes *nod* comunes o el gen *nodD*. Mutaciones en estos genes o su introducción en especies heterólogas provocan un cambio en la especificidad de hospedador. Hasta la fecha se han descrito un gran número de genes *nod* específicos pero se desconoce la función de muchos de ellos. En la figura 4 se muestra la regulación de los genes *nod* a través del gen *nodD*.

Papel de las hormonas en la organogénesis vegetal.

Se sabe que en los procesos de diferenciación celular y organogénesis en plantas está involucrada la participación de fitohormonas como auxinas, giberelinas, citocininas y el etileno. La presencia, ausencia o concentración relativa de estas sustancias establece los patrones organogénicos vegetales regulados por la misma planta, factores bióticos y abióticos. Así, las citocininas se sintetizan en las raíces y son transportadas a través del xilema hacia las hojas, promueven la germinación, formación de brotes, crecimiento del mesófilo, expansión de la hoja, dominancia apical, desarrollo de frutos jóvenes, la movilización de nutrientes, ayudan a prevenir la senescencia de las hojas y junto con las auxinas inducen la división y el alargamiento celular. Se ha visto que el tratamiento de hojas con citocininas estimulan la apertura de los estomas y la transpiración para reducir el turgor de la planta (Goodwin, 1978). Se ha propuesto que las citocininas podrían unirse a proteínas parecidas a receptores de unión a membrana celular y que podrían ser receptores cinasas (Claes et al., 1991).

El ácido abscísico (ABA) se sintetiza en hojas y frutos, es transportado basipétalmente (de la regiones apicales hacia la regiones basales de la planta); se encuentra en todos los órganos, es un inhibidor del crecimiento. Su acción primaria parece ser la de inhibir la acción de las giberelinas, estimula el letargo y la senescencia, induce la maduración de hojas y raíces, promueve la adaptación de la planta ante estrés ambiental, media el cierre de los estomas bajo el efecto de sequía, inhibe la síntesis de proteínas y RNA ribosómico (Bidwell, 1979; Giraudat et al., 1994), regula la expresión de genes involucrados durante el letargo de la semilla, así como durante su desarrollo contra factores desfavorables del

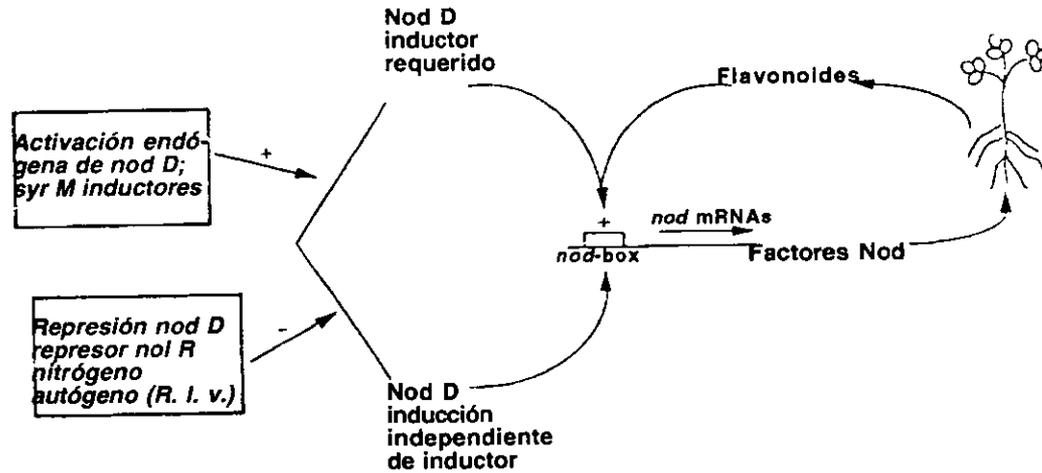


Figura 4. Regulación de los genes *Nod* a través de *NodD*.
Las flechas indican rutas regulatorias.

- + Controles positivos
- Controles negativos

ambiente como sequía, luz, salinidad y frío (Chen et al., 1983; Hughes et al., 1991). Los receptores en ABA no han sido bien identificados.

Las giberelinas se sintetizan en casi todos los tejidos pero especialmente en las áreas de activo crecimiento como son los embriones y los tejidos meristemáticos, se transportan a través del floema o el xilema, estimulan el crecimiento del mesófilo, la germinación de semillas, el desarrollo de flores, la elongación de brotes, internodos, hipocotilo, epicotilo, coleoptilo y mesocotilo, el crecimiento celular de la punta de las raíces, formación de las hojas, regulan la división celular en el cambium y en los meristemas, estimulan la división celular en el ápice del tallo así como su alargamiento, junto con auxinas y citocininas estimulan el desarrollo de frutos, ayudan al transporte de calcio a través de las células de aleurona que se encuentran en el endospermo, inducen la expresión de genes como *Adh*, *Basl* en células de aleurona y *Chs*, *Ant17* en flor, aceleran la síntesis de RNA total (Baluska et al., 1993; Gillaspay et al., 1993; Martin, 1993). En algunos tejidos si se aplica primero ácido indolacético (IAA), el ácido giberélico (GA) tiene un efecto mínimo; pero si el GA se aplica primero el IAA tiene un efecto estimulante. Esto sugiere que la acción de la giberelina ocurre en algún sitio que precede a la acción de la auxina (Bidwell, 1979).

El etileno se sintetiza en frutos, flores, tallos y raíces, inhibe la elongación del tallo, promueve la iniciación de la raíz y la maduración de los frutos, la abscisión, la senescencia y el geotropismo, inducen un rápido recambio de mRNA y proteínas los cuales inician el proceso de maduración, induce la expresión de genes que responden en defensa contra patógenos (Oelles et al., 1991; Abeles et al., 1992; Theologis, 1992); junto con las citocininas regulan el potencial de agua de la célula, la permeabilidad de la membrana y la fotosíntesis (Zarembinski y Theologis, 1994). Se han clonado algunos genes responsables para la síntesis y recepción del etileno.

Las auxinas son sintetizadas por hojas jóvenes y raíces, influyen en diversos procesos de crecimiento de la planta tales como la elongación celular, división, formación de raíces, diferenciación celular, actividad del cambium, crecimiento del tejido vascular, tropismos, previene la abscisión (Droog et al., 1993). Regulan la síntesis de mRNA codificando para polipéptidos necesarios para el desarrollo de la planta, actúan a nivel transcripcional y postranscripcional rápidamente (Key, 1969). La aplicación de auxinas y giberelinas induce la elongación de internodos y el desarrollo de frutos partenocárpico. Se ha demostrado que citocininas y auxinas exógenas estimulan la división celular en raíces, pero citocininas exógenas solas inhiben la elongación celular de tallos e

hipocotilos promovidos por auxinas (Vanderhoef et al., 1975). La aplicación de giberelinas exógenas conduce a un incremento del nivel de auxinas endógenas. Altas concentraciones de auxinas estimulan la síntesis de etileno el cual suprime la elongación celular. Las auxinas estimulan la degradación de las citocininas (Hansen et al., 1985). Se han detectado cambios específicos en la síntesis de proteínas en células de epicotilo de chícharo, tratadas con 20 μM de IAA, causando un incremento en la traducción del mRNA después de 10 min. de tratamiento (Patterson et al., 1967). Una concentración de 2.5 mM de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) promueve la síntesis de RNAr debido a un incremento de la RNA polimerasa I, en células de hipocotilo de soya (Guilfoyle et al., 1975)

Una de las distinciones más importantes entre las auxinas naturales como el IAA y algunas auxinas sintéticas como los ácidos naftalenacético (NAA) o el diclorofenoxiacético (2,4-D) es que los compuestos sintéticos son más estables (Bidwell, 1979) ya que no se degradan con tanta facilidad como las auxinas naturales, por lo que su efecto es más duradero.

El transporte polar de las auxinas en las raíces se lleva a cabo basipétalmente de célula a célula vía membrana plasmática y pared celular, moviéndose en el citoplasma y siendo excretada por acarreadores para ser transportada a través del cambium vascular, el floema y el parénquima hacia coleoptilos, vástagos, hipocotilos, peciolo y raíces; no obstante en algunas regiones de la raíz el transporte de auxinas se lleva a cabo acropétalmente (de la región basal a la región apical, en los tejidos de la planta). Existen varias hipótesis para el transporte de las auxinas, por ejemplo para IAA que tiene un pK de 4.7, para entrar a la célula se disocia en IAAH y IAA^- , las membranas se vuelven más permeables a IAAH a pesar del gradiente eléctrico favorable a IAA^- ; sin embargo, el citoplasma que es eléctricamente negativo con respecto a la pared y tiene un pH mayor de 4.7 provoca que adentro el IAAH se disocie en IAA^- y así éste sea llevado por un acarreador hacia el exterior.

La existencia de segundos mensajeros para el transporte de auxinas ha sido estudiada; por ejemplo, se ha demostrado que bloqueadores de canales de calcio inhiben el crecimiento inducido por auxinas en *Avena sp.* (Brock et al., 1992). Se ha demostrado también que cambios en el pH citoplasmático pueden actuar como segundos mensajeros (Felle et al., 1988). Receptores a auxinas han sido estudiados y tienen un papel importante, se ha demostrado que una mutación en el gen *dgt* en tomate, el receptor se vuelve insensible a auxinas exógenas, alterando el transporte de auxinas (Kelly et al., 1986).

Efecto de las hormonas y los factores Nod en la formación del nódulo.

En la mayoría, si no es que en todos los procesos de organogénesis están involucrados la expresión de genes específicos. Un gran número de genes que responden ante hormonas han sido clonados y secuenciados (Ulmasov et al., 1995); estos genes han sido estudiados en coleóptilo de maíz, hipocotilo de soya, epicotilo de chícharo, entre otros (Hagen et al., 1984). Algunas de estas hormonas, en especial auxinas y citocininas, promueven cambios o inducen la expresión de genes de la planta para el desarrollo de los nódulos en estadios específicos; así, las giberelinas cambian los niveles de Ca^{2+} en la membrana (Hirsch, 1992); la citocinina benziladenina induce la división de las células corticales en soya, cowpea alfalfa e inducen la formación de pseudonódulos en *Alnus sp.*; el etileno está involucrado en la orientación de los microtúbulos celulares y ayuda a la formación de nódulos (Hirstch, 1992). Mutaciones en la vía de síntesis del triptófano el cual es el precursor para la síntesis del IAA, causa alteraciones para la formación del nódulo en *R. l. bv. viciae* (Kondorosi y Johnston, 1981). Se ha demostrado que el nucleósido uridina, que se encuentra en la región central de la raíz llamada estele, ayuda para que se dé la división celular de las raíces corticales de la planta de chícharo en presencia de auxinas y citocininas, lo que sugiere que otras moléculas, además de las hormonas, están involucradas en el proceso de nodulación (Spaink, 1996). Se ha visto que si se inhibe la acción de auxinas y citocininas, los nódulos no se forman o se forman pseudonódulos que parecen raíces modificadas y hay una expresión de nodulinas tempranas que no deberían expresarse. Se ha visto que los flavonoides son en gran parte inhibidores de auxinas.

También los factores Nod al igual que las hormonas actúan como reguladores del crecimiento y en la formación de nódulos. Se ha visto que plantas no leguminosas poseen al menos un mínimo de estas señales ya que células de protoplasto aisladas de mesófilo de tabaco (*Nicotiana tabacum*) aumentan su división celular y la expresión del gen nodulina ENOD40 cuando se les añaden factores Nod y auxinas. Concentraciones de auxinas por sí solas suprimen la división celular, por lo que se ha postulado que los factores Nod y las nodulinas causan un cambio en el balance fitohormonal que conduce subsecuentemente a la división de las células (Röhrig et al., 1995). Por otro lado, se propone que los factores Nod activan una vía de traducción de señales que resultan en un incremento en el nivel de citocininas para inducir la división de células corticales. Los factores Nod al igual que el gen ENOD40 disparan la

división celular induciendo cambios en las concentraciones auxina-citocinina (de Sande et al., 1996).

En condiciones fisiológicas las auxinas se encuentran a una concentración de 10^{-5} M en tallo y coleóptilo mientras que en raíz se encuentra a una concentración de 10^{-8} M. La mayoría de los genes se inducen ante auxinas en una concentración de 1×10^{-8} M a 5×10^{-4} M. La aplicación de concentraciones altas de IAA inactiva la RNA polimerasa II y a concentraciones menores se reduce la actividad transcripcional de genes que responden a auxinas (Abel et al., 1995); aunque se ha visto que concentraciones mayores de 10^{-7} M estimulan la síntesis de etileno, pero una concentración de 10^{-3} M es recomendable para su aplicación, se difunden a temperaturas favorables entre 20 y 30 °C, en condiciones de oxígeno para mantener el transporte polar y pueden ser transportadas en contra de un gradiente de concentración.

Dado que esta variedad de factores Nod y auxinas guardan una relación funcional semejante en la organogénesis del nódulo, nuestro objetivo es aislar y estudiar la expresión de secuencias que son inducidas por factores Nod y auxinas para la formación del nódulo.

OBJETIVOS

Rhizobium tropici es una especie que es capaz de nodular un gran número de leguminosas no relacionadas genéticamente. Entre los hospedadores más importantes de esta especie se encuentran plantas de gran importancia económica como *Phaseolus*, *Leucaena*, *Medicago* y *Macroptilium*. Actualmente se está utilizando cepas de *R. tropici* junto con cepas del género *Azospirillum*, como inóculo para árboles de *Leucaena* en un programa de reforestación de la selva baja caducifolia del Estado de Morelos. Debido a que esta bacteria produce una gran variedad de factores Nod y que junto con las auxinas de la planta tienen un papel común en la diferenciación celular y en la formación de órganos, creemos que puede haber un mecanismo general ontogénico para su desarrollo.

Objetivo General

Sabemos que hay genes que son modulados por auxinas, por factores y algunos otros por ambos, nuestro objetivo general es estudiar los mecanismos moleculares en el desarrollo de las plantas y como un enfoque a ello decidimos aislar genes modulados por factores Nod y auxinas para conocer los mecanismos de organogénesis en las plantas

Objetivo Particular

Nuestro objetivo particular es aislar genes que se inducen por factores Nod y auxinas ya que estos compuestos están involucrados en el proceso de división celular que lleva a la organogénesis del nódulo..

MATERIAL Y METODOLOGIA.

Tabla V, donde se muestran las cepas bacterias, plásmidos, secuencias y oligonucleótidos usados en este trabajo.

Cepas	Bacterianas	Características relevantes	Referencias
<i>R. tropici</i>	CIAT899	Silvestre, Rif ^R , Cm ^R , Amp ^R .	Martinez et al. (1991)
<i>R. tropici</i>	RSP900	Derivada de CIAT899, curada del pSym. Rif ^R , Cm ^R , Amp ^R .	Vargas et al. (1990)
<i>Escherichia coli</i>	XL11-blue	Células competentes, <i>Lac z</i> ⁻	Stratagene™
Plásmidos			
pGH3		1.2 kb, de soya, inducción ante hormonas	G. Hagen (1984)
pMP604		<i>nodD</i> FITA, Tc ^R , IncP	H. Spaink (1989)
pRK2073		Spc ^R . Plásmido cooperador	Ditta et al. (1980)
pKS*		Vector de clonación	Stratagene™
Oligonucleótidos			
OPR ₁		5' TGC GGG TCCT 3'	Operon Technologies™
PoliT ₁₁ CA		Amplifica mRNA, poli A 5'-----3'	Operon Technologies™

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

La cepa de *R. tropici* CIAT899/pMP604 la cual contiene el gen *nodD* FITA, que tiene actividad constitutiva, y la cepa *R. tropici* RSP900, curada del plásmido simbiótico, se plaquearon en medio PY (Beringer, 1974) conteniendo Rif más Tetra, y Rif respectivamente. Se dejaron crecer 48 hrs. a 30 °C. Como medio mínimo para la producción de factores de nodulación se usó el medio B⁻ (Spaink et al, 1992).

Por otra parte, las cepas de *E. coli* XL11 blue se cultivaron en medio LB a 37°C durante 24 hrs., para su posterior uso.

Preparación de medio PY para las cepas de *Rhizobium*.

Peptona de caseína	0.5 g
Extracto de levadura	0.3 g
CaCl ₂ ·6H ₂ O 0.7 M	1.0 ml
H ₂ O	c.s.p. 100.0 ml

El Medio de cultivo mínimo B⁻ es el siguiente:

Manitol	10.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.55 g
KNO ₃	0.55 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1.30 g
Fe(III)-NaEDTA	33.0 mg
Biotina	0.20 mg
Tiamina·HCl	5.0 mg
Sol. trazas	1.0 ml
Ajustar a pH 7.0	
Aforar con H ₂ O dest.	1.0 L

La solución de elementos trazas se preparó de la siguiente manera:

MnSO ₄	0.609 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.10 g
H ₃ BO ₃	1.27 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.40 g
CuSO ₄	0.04 g
H ₂ O	c.s.p. 1.0 L

La composición del medio LB es la siguiente:

Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
H ₂ O dest. c.s.p.	1.0 L

ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS.

Los antimicrobianos cloramfenicol, espectinomomicina y kanamicina se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración con membrana (nitrato de celulosa) de 0.45 μm de diámetro de poro; la rifampicina se disolvió en metanol y la tetraciclina en etanol al 50 %. Todas estas soluciones se conservaron a -20 °C hasta su posterior utilización, añadiéndose a los medios a las concentraciones finales indicadas.

Cloramfenicol	50 $\mu\text{g/ml}$
Rifampicina	50 $\mu\text{g/ml}$
Tetraciclina	15 $\mu\text{g/ml}$
Kanamicina	50 $\mu\text{g/ml}$
Espectinomomicina	80 $\mu\text{g/ml}$
Ampicilina	100 $\mu\text{g/ml}$

SOLUCIONES UTILIZADAS.

Solución al 7% de acrilamida para gel de secuencia.

Acrilamida	6.65 g
Bis-acrilamida	0.35 g
Urea	48.0 g
Buffer TBE 10x	10.0 ml
H ₂ O c.s.p.	100.0 ml

Filtrar y desgasificar

Preparación de MOPS 10x.

MOPS	41.99 g
Acetato de sodio	6.56 g
EDTA	3.72 g
Ajustar a pH 7.0 con NaOH	
H ₂ O dest. c.s.p.	1.0 L

Buffer de lisis para extracción de RNA.

	Para 200 ml
LiCl 8 M	2.5 ml
SDS 20 %	10.0 ml
Tris-NaOH 0.2 M, pH 9.0	100.0 ml
EDTA 0.5 M	4.0 ml
H ₂ O destilada	83.5 ml

Buffer de corrido para RNA.

MOPS 10x	500 µl
Formaldehído al 37%	875 µl
Formamida	2.5 ml
Colorante de carga: glicerol	250 µl
azul bromofenol 1%	125 µl
H ₂ O	125 µl
Bromuro de etidio	10 mg/ml
H ₂ O destilada c.s.p.	5.0 ml

Solución de hibridación.

SDS 7%	10.0 ml
NaH ₂ PO ₄ 2.0 M, pH 7.2	3.0 ml
EDTA 0.5 M, pH 8.0	40.0 µl
H ₂ O c.s.p.	20.0 ml

Gel de agarosa-formaldehído.

	Para 200 ml
Agarosa	2.4 g
MOPS 10x	20.0 ml
H ₂ O	174.0 ml
Calentar hasta ebullición y enfriar hasta temp. amb.	
Formaldehído al 37%	6.0 ml

Preparación de SSC 20x.

NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g
Ajustar a pH 7.0 con ácido acético	
Aforar con H ₂ O	1.0 L

OBTENCION DE FACTORES Nod.

Los factores de nodulación fueron obtenidos siguiendo el método de Spaink y colaboradores (1992). Como medio mínimo para la producción de factores de nodulación se utilizó el medio B⁻. Cada una de las cepas se inoculó en 100 ml de medio B⁻ conteniendo 5µl de Tc (15 µg/ml), dejándolas incubar 30 hrs. a 30 °C, 300 rpm; posteriormente, para la cepa CIAT899 se tomaron los 100 ml de cultivo y se virtieron en 6.0 L de medio B⁻ y para la cepa RSP900, se tomaron 8 ml de cultivo y se virtieron en 500 ml de medio B⁻, volviéndose a incubar 30 hrs. a 30 °C, 300 rpm. Terminado este periodo de incubación, se virtió 3.0 L de n-butanol al cultivo de la cepa CIAT899 para extraer los factores de nodulación y 250 ml a la RSP900 para obtener un extracto control; se incubaron 48 hrs. a 30 °C, 300 rpm. Posteriormente, se obtuvo el sobrenadante de cada una y se centrifugó a 5 000 rpm, 30 min. a 25 °C; volviéndose a obtener el sobrenadante con la ayuda de una pipeta. Los factores Nod de la CIAT899 se obtuvieron por evaporación en el rotavapor R110 (Brinkmann Instruments Inc.) y la solución obtenida de la cepa control RSP900 también fue pasada por el rotavapor. Se resuspendieron con acetonitrilo al 40%, se dejaron reposar 8 hrs. a 4 °C, guardándose a esta temperatura para su posterior utilización.

GERMINACION DE SEMILLAS.

Semillas de la planta *Phaseolus vulgaris* L. variedad negro Jamapa fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min., lavando después exhaustivamente con agua destilada estéril. Se pusieron a germinar sobre papel húmedo en charolas de aluminio esterilizadas, durante cinco días a 28 °C, en obscuridad total.

INCUBACION DE LAS RAICES EN UNA SOLUCION QUE DISMINUYE LA POZA ENDOGENA DE AUXINAS.

Una vez germinadas las plantas de *P. vulgaris*, 15 raíces por tratamiento fueron cortadas e incubadas en 150 ml de una solución de buffer K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , 10 mM, pH 6.0, 2% sacarosa (Maniatis et al., 1989), la cual disminuye la poza endógena de auxinas (solución desauxinante). Los primeros bloques experimentales fueron incubados 3hrs. a 28 °C, en obscuridad total, y los siguientes fueron incubados bajo las mismas condiciones pero en una agitadora (shaker) a 150 rpm para mantener la aereación y con un cambio de solución desauxinante a los 90 min. de incubación. Al término de esta incubación, las muestras fueron vertidas a su respectivo tratamiento problema y se detuvo cada tratamiento a su tiempo indicado, introduciendo las raíces en nitrógeno líquido.

PREPARACION DE LOS TRATAMIENTOS PROBLEMA PARA LAS MUESTRAS A ANALIZAR.

Control. Al terminar el tiempo de desauxinación, se escurrieron las raíces y se virtieron en 150 ml de solución desauxinante. Las muestras fueron incubadas durante su tiempo respectivo.

Inducción por factores de nodulación. Del extracto butanólico resuspendido en acetonitrilo de la cepa CIAT899 se tomaron 5 ml de factores Nod, se centrifugaron a 14 000 rpm, 5 min., el sobrenadante fue secado por vacío durante 30 min. y resuspendido 5 ml de CHAPS al 1%. De aquí se hicieron las diluciones de 2×10^{-3} y 2×10^{-4} , siendo el diluyente 150 ml de solución desauxinante para cada muestra. Las muestras se incubaron durante su tiempo respectivo.

Inducción por extractos de la cepa control RSP900. Del extracto butanólico resuspendido en acetonitrilo de la cepa RSP900 se tomaron 3 ml y se centrifugaron a 14 000 rpm, 5 min., se secaron por vacío 20 min. y se resuspendieron en 3 ml de CHAPS al 1%. De aquí se hicieron las diluciones de 2×10^{-4} siendo el diluyente 150 ml de solución desauxinante. Las muestras se incubaron a su tiempo respectivo.

Inducción por auxinas. Se hizo una solución 10 mM de ácido indolacético (IAA) o ácido naftalenacético (NAA) en 200 μ l de etanol absoluto y de aquí se hicieron diluciones para obtener concentraciones finales de 10 μ M en 150 ml de solución desauxinante para cada muestra. Las muestras se incubaron a su tiempo respectivo.

METODO DE EXTRACCION PARA RNA.

Trabajando en esterilidad total, al término de cada tiempo para cada una de las muestras tratadas, las raíces fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70 °C para la posterior extracción de RNA total. Las raíces se pulverizaron en un mortero con nitrógeno líquido. Una vez pulverizadas, se les virtió 2 ml de buffer extracción de lisis más fenol v/v por gramo fresco (V. medios y soluciones); se agitaron vigorosamente y se incubaron 15 min. a 25 °C, 100 rpm. Enseguida, se les agregó 1 ml de cloroformo por gramo fresco dejándolas nuevamente incubarse en las mismas condiciones. Cada solución fue vertida en tubos còrex y centrifugada a 9 500 rpm, a 25 °C, 30 min. (Beckmann, SS34); a la fase acuosa obtenida se le agregó 1 ml de cloroformo por gramo fresco, se

agitó y se centrifugó a 9 500 rpm, a 25 °C, 15 min.; a la fase acuosa obtenida por segunda ocasión, se le agregó un tercio de su volumen de LiCl 8 M dejándose incubar 24 hrs. a 4 °C. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 9500 rpm, 15 min. a 4 °C; las pastillas se lavaron con 2 ml de LiCl 2 M a 4 °C y dos veces con etanol al 80% a 4 °C para después secarlas por vacío y resuspenderlas con 1 µl de agua destilada esterilizada por cada 5 µg de RNA (aprox. 100 µg de RNA son obtenidos por g de raíz). El RNA obtenido de cada muestra fue cuantificado a 260 nm en el espectrofotómetro y se cargaron 20 µg por carril en los geles de agarosa-formaldehído.

SINTESIS DE cDNA A PARTIR DE RNA Y AMPLIFICACION POR PCR MARCANDO LOS OLIGOS POLI T₁₁CA Y OPR₁ (DIFFERENTIAL DISPLAY).

Las muestras obtenidas a las 15 hrs. con los tratamientos control, factores Nod 2×10^{-3} , NAA 10 µM y IAA 10 µM del primer bloque experimental obtenido (V. resultados) se les realizó la técnica de "despliegue diferencial" (Differential Display). Primero se obtuvo la síntesis de de cDNA a partir de RNA con la enzima reversotranscriptasa, utilizando el oligo Poli T₁₁CA. Las reacciones se incubaron 1 hr. a 37 °C y después 5 min. a 95 °C, guardándose a -10 °C para después amplificarlas mediante la técnica de PCR marcando los oligos PoliT₁₁CA y OPR₁ radiactivamente.

Síntesis de cDNA a partir de RNA.

		µl
Buffer RT	5x *	4.0
dNTP's	250 µM	1.6
RNA	0.3 µg	1.5
Poli T ₁₁ CA	10 µM	2.0
DTT	0.1 M	1.5
Transcriptasa reversa	MMLV *	1.0 (100 U)
H ₂ O esterilizada	c.s.p.	20.0

* Contenidos en el kit mRNAPTM (GenHunter Corp.)

Técnica por PCR para las cuatro muestras de cDNA, marcando radiactivamente los oligos.

Las cuatro muestras de cDNA obtenidas fueron amplificadas por PCR, utilizando los oligos OPR₁ y Poli T₁₁CA. Se marcaron primero por separado los oligos Poli T₁₁CA y el OPR₁ con 10 µCi de γ³²P dCTP (V. más adelante), incubándose cada reacción 30 min. a 37 °C y después 5 min. a 65 °C. Enseguida, se llevó a cabo la reacción de PCR donde cada muestra se corrió 40 ciclos y cada ciclo con incubaciones de: 94 °C-30 seg., 40 °C-90 seg. y 72 °C-30 seg. Terminado este tiempo, las muestras obtenidas por PCR fueron utilizadas para correrlas en un gel de secuencia.

**Reacción de marcaje 1
para Poli T₁₁CA**

	µl
Poli T ₁₁ CA 40 pM	0.5
Buffer T ₄ PNK (10x)	2.0
γ ³² P dCTP	1.0
Taq. polimerasa	0.5
H ₂ O destilada c.s.p.	20.0

**Reacción de marcaje 2
para OPR₁**

	µl
OPR ₁ 20 pM	1.0
Buffer T ₄ PNK (10x)	2.0
γ ³² P dCTP	1.0
Taq. polimerasa	0.5
H ₂ O destilada c.s.p.	20.0

Reacción de PCR

	µl
cDNA	3.0
Buffer 10x	2.0
dNTPs 25 µM	1.6
OPR ₁ de la reacción 2	1.0
Poli T ₁₁ CA de la reacción 1	1.0
Taq. polimerasa (Perkin-Elmer)	0.2
H ₂ O destilada c.s.p.	20.0

**OBTENCION, PURIFICACION Y MARCAJE
DE SONDAS RADIOACTIVAS.**

Obtención y purificación de la secuencia GH3.

La secuencia del gen GH3 de *Glycine max* (soya), clonada en el plásmido pKS⁺, fue obsequiada por el Dr. G. Hagen (Universidad de Minnesota). Dicha secuencia se purificó mediante el siguiente método: Las células competentes *E. coli* XL1-blue fueron transformadas con 600 ng del plásmido pGH3. La transformación se realizó introduciéndolas dos

veces en nitrógeno líquido durante dos minutos para después incubarlas dos minutos a 37 °C; enseguida se incubaron 1hr. en 1ml de LB a 37 °C 250 rpm. Al término, se centrifugaron a 10 000 rpm, durante 3 min. y la pastilla obtenida fue resuspendida en 200 µl de LB para después plaquear en LB más Amp, incubándose 15 hrs. a 37 °C. De las colonias obtenidas se purificó el plásmido mediante la técnica de lisis alcalina (Maniatis et al, 1982) y se digirió 3 hrs. a 37 °C con 10 U de EcoRI para después correr un gel de agarosa al 1.2% y aislar la banda correspondiente la cual fue purificada utilizando el kit GeneClean 1 (Bio101) para posteriormente utilizarla como sonda control en los tipo Northern blot.

Purificación de la secuencia T_{11CA}R₁O₁.

La secuencia T_{11CA}R₁O₁ se purificó mediante la técnica de despliegue diferencial (Differential Display): Se preparó un gel de acrilamida al 7%, éste fue calentado unos segundos para disolver la urea y filtrado en un matraz kitasato con papel filtro Whatman del número 1, enseguida se enfrió en hielo 5 min. y se le agregó 1 ml de persulfato de amonio al 10% más 25µl de TEMED. El gel se vertió en un aparato de electroforesis para secuencia, desplazando el vidrio sin formar ninguna burbuja; luego, se le colocaron pinzas en los extremos y se le puso el peine al revés para linealizar la parte superior. Se colocó papel mojado con buffer TBE 1x en los dos extremos y se dejó reposar durante 10 hrs. Transcurrido este tiempo, se montó el aparato de electroforesis, se cargaron 3.5 µl de cada una de las muestras obtenidas mediante la técnica de quinación por PCR más 2 µl de stopmix, incubándolas antes 20 seg. a 80 °C. Cada muestra se hizo por duplicado. El gel de secuencia se corrió con buffer TBE 1x durante 3.5 hrs. a 55 °C, 60 watts.

Una vez corrido el gel, se colocó en papel filtro whatman, se cubrió con egapack y se secó durante 1hr. a 80 °C. Después se expuso en un cassette durante 12 hrs. De la placa revelada se detectaron varias bandas que se inducían por factores y hormonas y estaban ausentes en el control sin tratar. Con la única que se trabajo fue la secuencia de aproximadamente 170 pb y que se llamó T_{11CA}R₁O₁. Dicha secuencia fue recortada del carril donde la muestra había sido tratada con factores Nod en extracto crudo durante 15 hrs.

A la secuencia de DNA aislada, se le agregó 100 µl de agua destilada estéril, se dejó incubar 10 min. a 95 °C para después centrifugar a 12 000 rpm durante 2 min., el sobrenadante obtenido se le vertió 10 µl de

acetato de sodio 3 M pH 4.8, se agitó y se le agregó 5 µl de glucógeno más 450 µl de etanol absoluto para precipitar el DNA y se incubó a -70 °C 30 min. Se centrifugó a 12 000 rpm 10 min. a 4 °C; la pastilla se lavó con 200 µl de etanol al 80% para después secarse por vacío. La pastilla se resuspendió en 10 µl de agua estéril y de aquí se utilizaron 20 pg/µl para su amplificación mediante PCR.

Amplificación de la secuencia T₁₁CA R₁O₁.

La secuencia fue amplificada por PCR durante 40 ciclos, donde cada ciclo consiste en incubaciones a: 94 °C-30 seg., 40 °C-90 seg. y 72 °C-30 seg.

		µl
dNTP's	2mM	10.0
OPR ₁	2µM	10.0
Poli T ₁₁ CA	10 µM	2.5
secuencia de DNA	20 pg/µl	2.0
Taq. Polimerasa (Perkin-Elmer)		1.0
H ₂ O destilada	c.s.p.	100.0

Marcaje de las sonda T₁₁CA R₁O₁ y GH3.

Para el marcaje de las sondas, 25 ng de DNA se resuspendieron en 10 µl de agua y se incubaron 2 min. a 95 °C para después incubarla 5 min. en hielo. Enseguida se le agregó 4.0 µl de cada uno de los oligos dATP, dTTP, dGTP más 5.0 µl de reacción buffer, 5.0 µl de primer, 13.5 µl de H₂O, 2.5 µl γ³²P dCTP (25 µCi) y 2.0 µl de enzima klenow. La reacción se incubó durante 2 hrs. a 37 °C.

Por otro lado, para obtener la marca incorporada, se preparó una columna cromatográfica con 1.0 ml de Sephadex G-50 a la cual se le vertió los 50 µl de la reacción anterior; se centrifugó a 1 800 rpm 3 min. a 4 °C (rotor S4 180, Beckmann). Las actividades de marca incorporada oscilaron entre 1 x 10⁷ a 1 x 10⁸ cpm/µg de DNA. Posteriormente se hibridó con las muestras de RNA transferidas en la membrana.

TECNICA DE NORTHERN BLOT

Se corrieron 20 µg de RNA de cada una de las muestras por carril en un gel de agarosa-formaldehído con buffer MOPS 1x pH 7.0 a 97 volts, 2 hrs. Posteriormente el gel fue lavado con 250 ml de SSC 4x y trasferido a una membrana de nylon (hybond-N⁺, Amersham Int.) utilizando SSC 2x como solución de transferencia, durante 15 hrs. Transcurrido este tiempo, la membrana se desnaturalizó con 100 ml de NAOH 50 mM, 5 min. para fijar el RNA a la membrana y 20 min. con 100 ml de SSC 2x. Enseguida la membrana fue prehibridada para evitar hibridaciones inespecíficas, con 10 ml de solución hibridación, 30 min. a 50 °C. La hibridación se llevó a cabo durante 12 hrs. con las mismas condiciones que la prehibridación pero añadiendo la sonda marcada radioactivamente utilizando para ello el kit Multiprime DNA labelling system (Amersham Int.) Después de este tiempo, la membrana se lavó con 100 ml de SDS 0.1%-SCS 2x a 50 °C y se expuso en una película Kodak X-Omat XK-1 por 12 hrs. donde al término de su exposición se procedió al revelado utilizando soluciones de revelador y fijador de la marca Kodak.

RESULTADOS

Obtención de la secuencia $T_{11}CA R_1O_1$ mediante la técnica de "despliegue diferencial" (Differential Display).

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los procesos de diferenciación celular en plantas. La interacción *Rhizobium*-leguminosa es un sistema adecuado para comprender este proceso, ya que se inducen genes de la planta para la formación de un órgano nuevo. La expresión de estos genes está modulada por la presencia de factores Nod, auxinas y otros compuestos. Por este motivo decidimos estudiar la interacción de *Rhizobium tropici*-*Phaseolus vulgaris*. Una de las técnicas usadas para aislar genes involucrados en procesos específicos es la de "despliegue diferencial" (Differential Display). Esta técnica consiste en aislar RNA de las condiciones a estudiar, obtener el cDNA y amplificarlo con la ayuda de oligos marcados radiactivamente para posteriormente aislar las bandas de DNA corridas en un gel de secuencia, que se expresan o se reprimen ante esas condiciones estando ausentes en los controles.

Utilizamos raíces de plantas de frijol germinadas durante 5 días para hacer la técnica de despliegue diferencial; 15 raíces por tratamiento fueron cortadas e incubadas en 150 ml de solución desauxinante durante 3 hrs, a 28 °C, en oscuridad total, para disminuir la poza endógena de auxinas. Posteriormente las raíces fueron vertidas a su respectivo tratamiento, siendo los siguientes: Para el tratamiento problema con factores Nod utilizamos un extracto butanólico de factores Nod sintetizados por la cepa *R. tropici* CIAT899. Este extracto contiene los factores Nod descritos por Folch et al, 1994 (V. introducción). Del extracto butanólico se hizo una dilución de 2×10^{-3} siendo el diluyente 150 ml de solución desauxinante. Para los tratamientos con auxinas, se prepararon IAA o NAA a una concentración 10 μ M siendo el diluyente la misma cantidad de solución desauxinante (V. material y metodología). Se puso una muestra control que consistió únicamente en un cambio de solución desauxinante a las 3 hrs. Después de las 3 hrs. de desauxinar las raíces, éstas fueron vertidas a su tratamiento respectivo y partir de aquí fueron incubadas durante 15 hrs. bajo las mismas condiciones. A cada muestra de raíces obtenidas se les extrajo el RNA total (V. método de extracción para RNA) y para la síntesis de cDNA utilizamos el oligo comercial poli $T_{11}CA$ debido a que todos los mRNA eucariotes tienen un extremo 3' Poli A, lo cual evita las copias de los rRNA y tRNA que se encuentran en abundancia. Las dos bases finales del Poli $T_{11}CA$ fueron usadas al azar. Después de obtener los cDNAs, éstos se amplificaron mediante PCR utilizando los oligos OPR₁ y Poli $T_{11}CA$ marcados radiactivamente. Usamos el oligo OPR₁ comprado de una marca

registrada donde su secuencia de 10 bases se encuentra al azar en un gran número de los cDNA para ser amplificados (V. tabla V). Posteriormente, las 4 muestras de cDNA se corrieron por duplicado en un gel de secuencia y una vez corrido el gel se secó y se expuso en una película Kódak durante 12 hrs. En la placa revelada detectamos varias bandas que se expresaban por factores y auxinas y estaban ausentes en el control (V. figura 5). En esta figura podemos ver una gran cantidad de bandas que se encuentran tanto en los tratamientos como en los controles, sin embargo hay dos bandas que se encuentran presentes en los tratamientos y están ausentes en el control; estas dos secuencias de aproximadamente 170 y 200 pb que les llamamos $T_{11CA}R_1O_1$ y $T_{11CA}R_1O_2$ respectivamente, fueron cortadas del carril donde la muestra había sido tratada con factores Nod y después se purificaron y amplificaron mediante PCR (V. purificación y amplificación de las secuencias en material y metodología). En la figura 6 se muestran las bandas de 170 y 200 pb corridas en un gel de agarosa al 1.2 %.

Para comprobar que estas secuencias se expresaban por los tratamientos y estaban ausentes en el control, se hizo un experimento tipo northern utilizando el mismo RNA que usamos para el despliegue diferencial. De acuerdo a la técnica de northern descrita en la metodología, las secuencias $T_{11CA}R_1O_1$ (170 pb) y $T_{11CA}R_1O_2$ (200 pb) se utilizaron como sondas, se marcaron radiactivamente y se hibridó cada una de ellas con las muestras de RNA. En las muestras de RNA hibridadas con la secuencia $T_{11CA}R_1O_2$ se observa una expresión constitutiva del transcrito ya que esta secuencia hibridó tanto en los tratamientos como en el control con la misma intensidad (datos no mostrados), por este motivo esta secuencia fue descartada. En la figura 7 se muestra la hibridación de la secuencia $T_{11CA}R_1O_1$ (170 pb) con un RNA presente en las muestras tratadas con factores Nod y auxinas, detectándose una ligera hibridación basal en el RNA control. Estos niveles de expresión son comparables debido a que en los paneles inferiores se encuentran los rRNA teñidos con brumuro de etidio y en los cuales se observan cantidades similares de RNA cargados por carril. La hibridación se observó entre el ribosomal mayor 28S y el ribosomal menor 18S que fueron utilizados como marcadores internos, dando como resultado hasta ahora obtenido, la expresión del transcrito primario de aproximadamente 2.0 kb y que lo llamamos R_1O_1 . Podemos apreciar que el producto del gen R_1O_1 se expresa más por auxinas que por factores Nod, habiendo una mayor expresión por NAA que por IAA (figura 7).

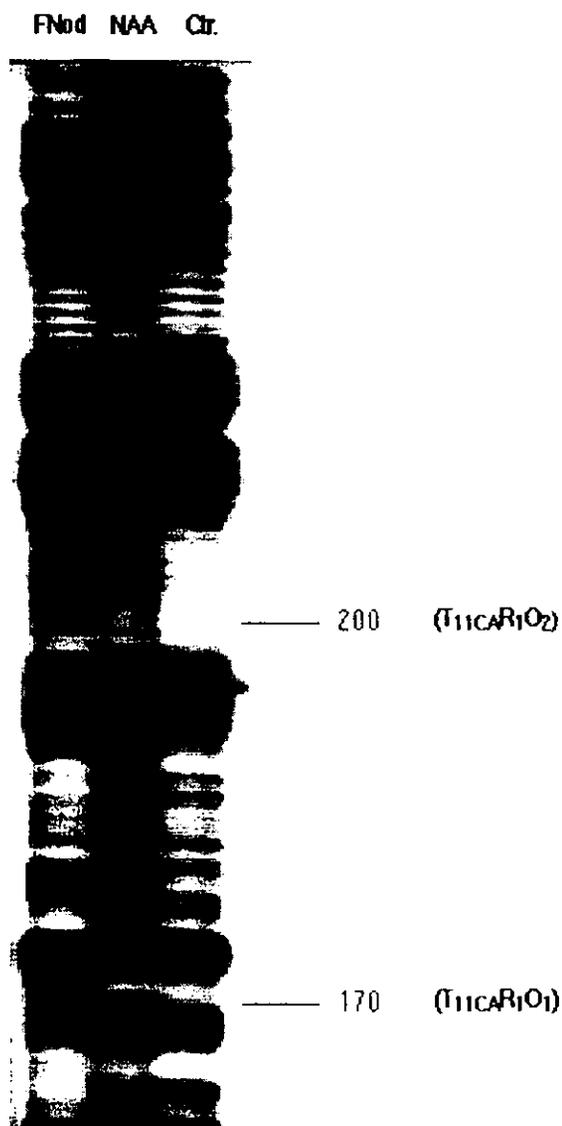


Fig. 5 Despliegue diferencial de RNAs mensajeros de raíces de *Phaseolus vulgaris* L., tratadas con auxinas $10 \mu\text{M}$ y factores Nod de un extracto butanólico, 2×10^{-3} . En la figura se muestran dos secuencias de cDNA con un peso molecular de aprox. 170 y 200 pb, las cuales se inducen por factores Nod y auxinas, estando ausentes en el control.

Pst I A B

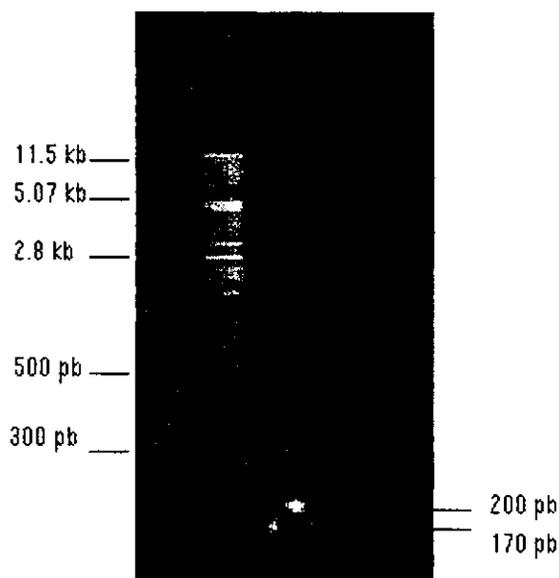


Fig. 6

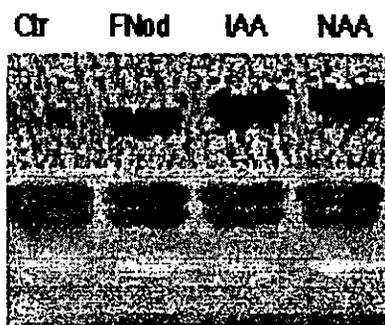


Fig. 7

Fig. 6 y 7. En la figura 2 se muestra las secuencias T₁₁CAR₁O₁ de 170 pb y T₁₁CAR₁O₂ de 200 pb obtenidas de gel de secuencia y corridas en un gel de agarosa al 1.2 %; en el primer carril se muestra el DNA del fago lamda digerido con la enzima de restricción Pst I. En la figura 3 se muestra la hibridación tipo northern de la secuencia T₁₁CAR₁O₁ contra el RNA total obtenido de raíces de *Phaseolus vulgaris* L., donde se observa una expresión del transcrito R₁O₁ por factores Nod en una dilución 2×10^{-3} (FNod) y hormonas $10 \mu\text{M}$ (IAA y NAA), de muestras obtenidas durante 15 horas de tratamiento. Los factores Nod fueron obtenidos de un extracto butanólico de la cepa *R. tropici* CIAT899. En el panel 2 se observan los RNAs ribosómicos teñidos con bromuro de etidio.

Niveles de expresión del transcrito R_1O_1 por factores Nod y auxinas.

Una vez comprobada la expresión del transcrito R_1O_1 por factores Nod y auxinas en muestras de raíces tratadas durante 15 hrs., decidimos explorar su inducción temporal haciendo experimentos tipo northern. Trabajamos con un bloque experimental en el cual obtuvimos muestras de los tratamientos a distintos tiempos, manteniendo las mismas condiciones de incubación. Para descartar que moléculas hidrofóbicas como lipo-polisacáridos (LPS) y exopolisacáridos (EPS) que se encuentran resuspendidas en el extracto butanólico fueran las responsables de la inducción, utilizamos como control la cepa *Rhizobium tropici* RSP900 que no produce factores Nod porque no contiene el plásmido simbiótico. Del extracto butanólico obtenido de esta cepa se hizo una dilución 2×10^{-3} siendo el diluyente 150 ml de solución desauxinante para cada muestra; se obtuvieron muestras a los tiempos 15 y 48 hrs. Asimismo, otros controles fueron utilizados, los cuales consistieron en cambiar únicamente la solución desauxinante a raíces a las 3 hrs., obteniendo muestras a los tiempos 0 y 15 hrs. Los factores Nod en extracto butanólico y las auxinas fueron preparados de igual manera que el bloque experimental anterior. Para las muestras de raíces tratadas con factores Nod se obtuvieron RNAs a los tiempos 30 min., 1, 3, 6, 9, 12, 15, 24 y 48 hrs. y para las muestras de raíces tratadas con NAA o IAA se obtuvieron RNAs a los tiempos 12 y 15 hrs. de cada una. Los RNA totales fueron utilizados para ser hibridados con la sonda $T_{11CA}R_1O_1$ mediante la técnica de northern.

En la figura 8 podemos ver que el transcrito R_1O_1 se induce por factores Nod y auxinas. Por una parte, en los carriles cargados de RNA de raíces tratadas con factores Nod se observa una hibridación entre el transcrito R_1O_1 y la sonda $T_{11CA}R_1O_1$ de 170 pb obtenida por despliegue diferencial; podemos alcanzar a apreciar una inducción del transcrito R_1O_1 desde las 3 hasta las 15 hrs. (figura 8A y B), mientras que a las 24 y 48 hrs. ya no se observa esta inducción; esto pudo ser debido a que las raíces a estos tiempos se encontraban amarillas y muy delgadas quizá porque ya estaban muertas. Otra explicación a esto es que se haya terminado el efecto de los factores Nod en la inducción del transcrito R_1O_1 (figura 8A). Por otra parte, en raíces tratadas con IAA y NAA podemos observar también una ligera inducción del transcrito R_1O_1 a las 12 y a las 15 hrs. (figura 8B), habiendo una inducción mayor en raíces tratadas con NAA que con IAA. En los carriles cargados con RNA de raíces tratadas únicamente con solución desauxinante a los tiempos 0 y 15 hrs. y raíces tratadas con el extracto de la cepa RSP900 a los tiempos 15 y 48 hrs., se

observa una expresión mínima del transcrito R_1O_1 . Creemos que esta expresión mínima en los controles pueda ser debido a varias causas: a) el transcrito R_1O_1 se encuentra expresado desde que se cortan las raíces o desde antes y que disminuye su expresión durante las 3 hrs. en que las raíces están desauxinándose, de tal manera que contando el tiempo cero después de este periodo de desauxinación hasta las 15 hrs. se mantiene una mínima expresión del R_1O_1 . Esto podría ser debido a que la cantidad de solución desauxinante quizá no disminuya por completo la poza endógena de auxinas por lo cual éstas mantengan en un mínimo la expresión del transcrito; b) las condiciones de hibridación no fueron suficientemente estrictas y la señal detectada podría deberse a una hibridación cruzada con mensajeros similares (V. discusión).

Como se mencionó anteriormente, a las 24 y 48 hrs. no se observa ninguna expresión del transcrito. Para descartar si es porque ya estaban muertas las raíces o a esos tiempos ya no se inducía el R_1O_1 , decidimos mejorar las condiciones de incubación para lograr que las raíces se mantuvieran en mejores condiciones durante largos periodos de tiempo.

Las nuevas condiciones de incubación consistieron en hacer un cambio de solución desauxinante a los 90 min., así como mantener las muestras en una agitadora a 150 rpm, en obscuridad total, a 28 °C. El cambio de solución desauxinante se hizo para disminuir la poza endógena de auxinas y al estar mejor aireadas las raíces, éstas podrán mantenerse mucho más tiempo en este medio.

Bajo estas condiciones de incubación las raíces se mantuvieron con un aspecto similar al de las primeras horas siendo esto indicativo de su sobrevivencia. Obtuvimos muestras de raíces tratadas con factores Nod a una dilución de 2×10^{-3} a los tiempos 1, 3, 6, 9, 12, 15, 24 y 36 hrs.; muestras de raíces tratadas con IAA o NAA a una concentración $10 \mu\text{M}$ a los tiempos 1, 3, 12 y 24 hrs.; una muestra control de raíces tratadas con solución desauxinante durante 15 hrs. y una muestra de raíces tratadas con el extracto control de la cepa RSP900 en una dilución 2×10^{-3} durante 24 hrs. Extrajimos el RNA total a cada una de estas muestras y de acuerdo a la metodología antes mencionada, realizamos la técnica de northern utilizando como sonda la secuencia $T_{11CA}R_1O_1$ marcada radiactivamente.

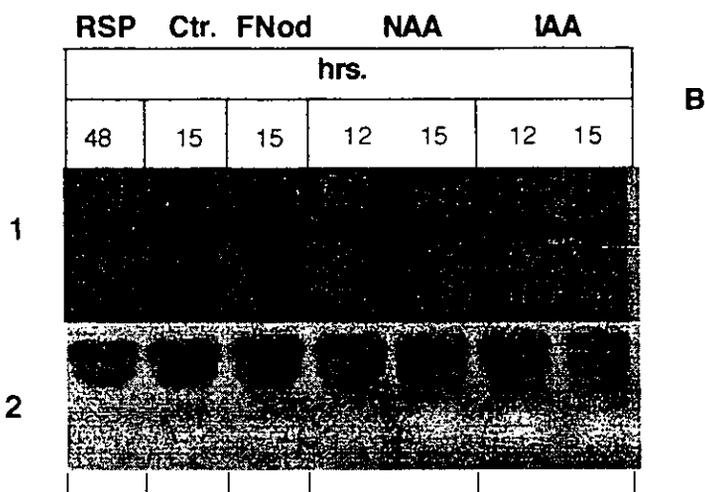
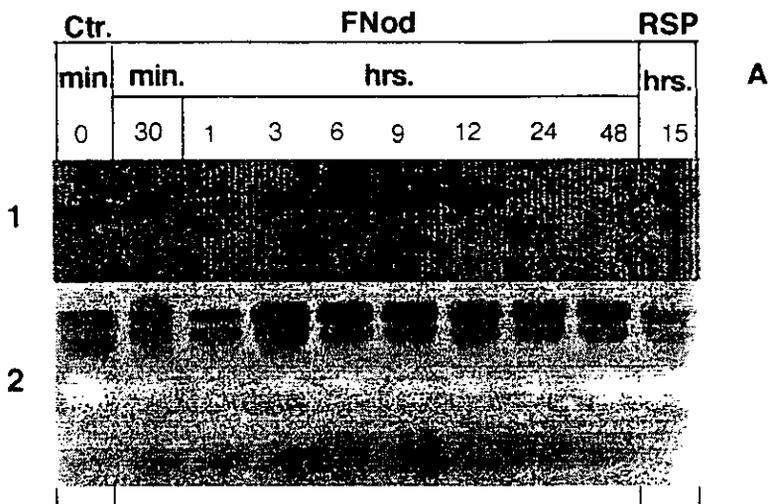


Fig. 8 Hibridación tipo northern de RNA total obtenido de raíces de *Phaseolus vulgaris* L. contra la sonda T11CAR101 (170 pb). Los tratamientos son los siguientes: Ctr.: usando sólo solución desauxinante; RSP: extracto control de la cepa *R. t.* RSP900 curada del plásmido simbiótico, 2×10^{-3} ; FNod: factores Nod obtenidos de un extracto butanólico, 2×10^{-3} ; NAA: ácido naftalenacético $10 \mu\text{M}$ y IAA: ácido indolacético $10 \mu\text{M}$. En los primeros paneles se muestra la hibridación con la sonda y en los segundos se muestran los RNAs ribosómicos teñidos con bromuro de etidio.

En la hibridación de la sonda $T_{11CA}R_1O_1$ con el transcrito R_1O_1 de raíces obtenidas bajo diferentes tratamientos podemos observar que en la muestra control de raíces tratadas sólo con solución desauxinante vemos que a las 15 hrs. hay una mínima expresión del transcrito R_1O_1 (V. figura 9A). En raíces tratadas con el extracto de la cepa RSP900, el transcrito R_1O_1 muestra un mínimo de expresión a las 24 hrs. (V. figura 9B). Al parecer el cambio de solución desauxinante a los 90 min. no logró disminuir completamente la poza endógena de auxinas o hay una hibridación cruzada (V. discusión). En raíces tratadas con factores Nod, éstos mantienen la inducción del R_1O_1 desde las primeras horas hasta las 36 hrs. Por otro lado, el transcrito R_1O_1 es inducido desde las primeras horas para después comenzar a disminuir ligeramente a las 12 y 24 hrs. en raíces tratadas con IAA (V. figura 9B). Podemos apreciar también que el transcrito R_1O_1 es inducido por NAA desde tiempos cortos, habiendo una máxima inducción a las 12 hrs. y una ligera disminución a las 24 hrs. Cabe decir que hay una mayor inducción del R_1O_1 por NAA que por IAA. V. figura 9.

Debido a que el transcrito R_1O_1 se induce desde las primeras horas tanto por factores Nod como por NAA e IAA, llevamos a cabo otro experimento usando las condiciones de incubación de la figura 9. En este experimento se tomaron muestras en minutos para ver en que momento comenzaba su inducción, así como también comprobar que el transcrito es inducido por auxinas y mantiene su inducción por factores Nod. Para este bloque experimental se obtuvieron muestras de RNA de raíces tratadas con factores Nod en una dilución de 2×10^{-4} a los tiempos 15, 30, 45 min., 1, 2, 4, 9 y 12 hrs., así como de muestras de raíces tratadas con NAA a una concentración de $10 \mu M$ a los tiempos 15, 30, 45 min. y 1, 2, 4, 9, 12 y 15 hrs., e IAA a una concentración de $10 \mu M$ a los tiempos 30, 45 min., 4 y 9 hrs. Para las muestras controles únicamente se utilizó solución desauxinante con un cambio de esta solución a los 90 min. y a las 3 hrs., obteniendo muestras a los tiempos 15, 30, 45 min., 1, 2, 4, 9 y 12 hrs. A cada muestra se le extrajo el RNA y se realizó la técnica de northern utilizando como sonda marcada la secuencia $T_{11CA}R_1O_1$ obtenida por despliegue diferencial.

En los carriles de RNA de raíces tratadas con únicamente solución desauxinante, vemos que hay una expresión mínima basal del transcrito R_1O_1 desde los 15 min. hasta las 12 hrs. (V. figura 10A). En los carriles de RNA de raíces tratadas con factores Nod podemos ver que los factores Nod inducen el transcrito desde los 30 min. y lo mantienen inducido hasta las 12 hrs. En el experimento anterior (V. figura 9A) se muestra que la inducción se mantiene hasta las 36 hrs. En raíces tratadas con NAA, esta

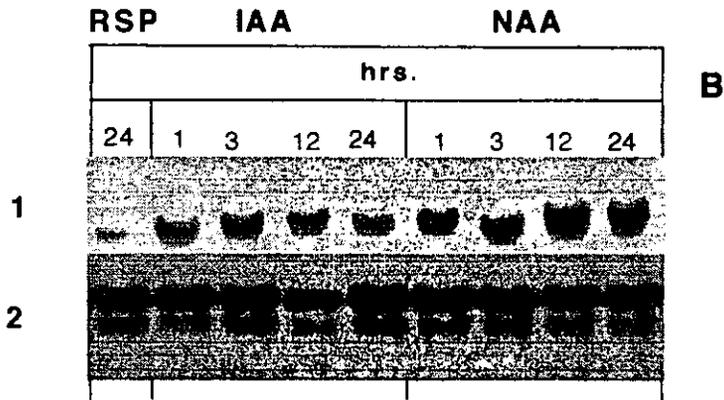
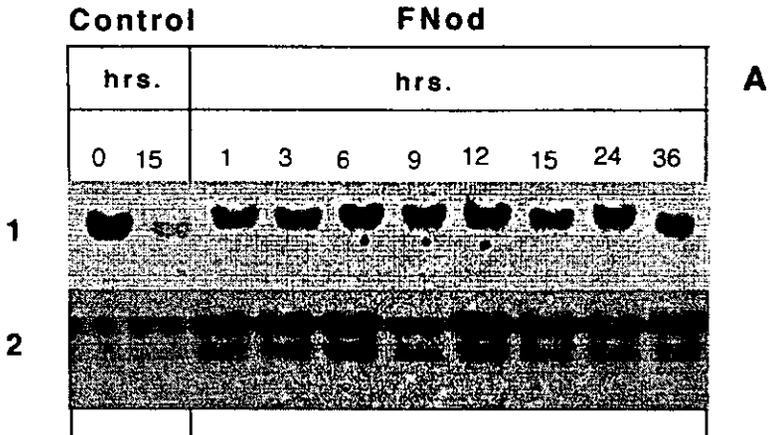


Fig.9 Hibridación tipo northern de RNA total obtenido de raíces de *Phaseolus vulgaris* L. contra la sonda T11CAR101 (170 pb). Los tratamientos son: Controles: utilizando sólo solución desauxinante; RSP: extracto control de la cepa *R. t.* RSP900 en una dilución 2×10^{-3} ; FNod: factores Nod de un extracto butanólico en una dilución 2×10^{-3} ; IAA: ácido indolacético $10 \mu\text{M}$ y NAA: ácido naftalenacético $10 \mu\text{M}$. En los paneles 1 se muestra la hibridación con la sonda y en los segundos se observan los RNAs ribosómicos teñidos con bromuro de etidio.

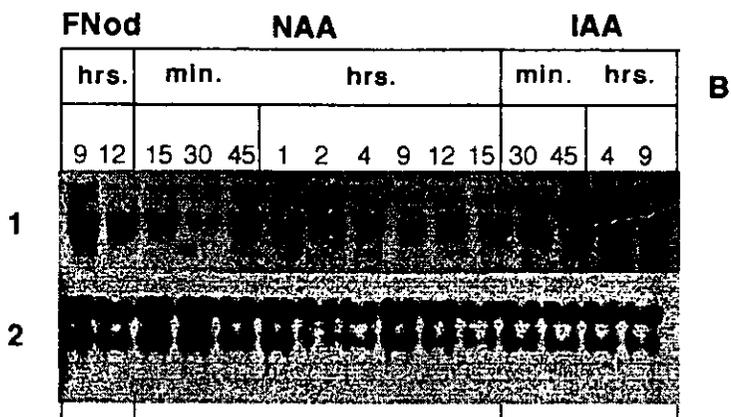
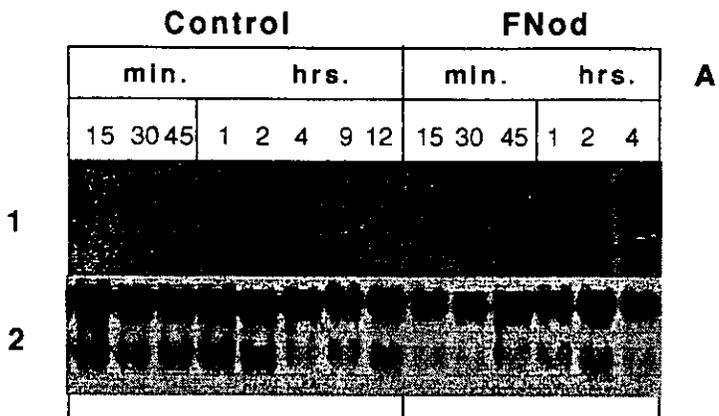


Fig 10. Hibridación tipo northern de RNA total obtenido de raíces de *Phaseolus vulgaris* L. contra la sonda T11CAR101 (170 pb). Los tratamientos son: Control: sólo solución desauxinante; FNod: factores Nod de un extracto butanólico en una dilución 2×10^{-4} ; NAA: ácido naftalenacético $10 \mu\text{M}$ y IAA: ácido indolacético $10 \mu\text{M}$. En el primeros paneles se muestra la hibridación con la sonda y en los segundos se observan los RNAs ribosómicos teñidos con bromuro de etidio.

auxina induce el transcrito R_1O_1 desde las 2 hrs. hasta las 15 hrs. con una máxima inducción entre las 2 y las 4 hrs. (figura 10B). Por otra parte, en muestras de raíces tratadas con IAA, ésta induce el transcrito R_1O_1 desde los 30 min. hasta las 9 hrs. observándose una mayor inducción conforme transcurre el tiempo de incubación (figura 10B). Si comparamos los tres últimos experimentos realizados, podemos decir que el transcrito R_1O_1 se induce por IAA desde los 30 min. hasta las 12 hrs., encontrándose hasta las 24 hrs.; la auxina NAA induce el transcrito desde los 15 min. hasta las 24 hrs. y por último, los factores Nod inducen el transcrito desde los 30 min. y lo mantienen inducido hasta las 36 hrs.

Para comprobar que nuestro medio de solución desauxinante funcionaba perfectamente disminuyendo la poza endógena de auxinas de las raíces se procedió a realizar un experimento usando el gen inducible por auxina GH3 (Hagen, 1984). De acuerdo a la metodología mencionada, el plásmido pGH3 se digirió con EcoRI y se purificó la banda de 1.2 kb correspondiente a la secuencia GH3 la cual fue purificada y corrida en un gel de agarosa (V. figura 11). Esta secuencia se utilizó como sonda para ser hibridada con el RNA de las muestras de raíces obtenidas bajo diferentes tratamientos, siguiendo la misma técnica de northern. Bajo las mismas condiciones de incubación de la figuras 9 y 10, quince raíces por tratamiento fueron utilizadas. Se obtuvo RNA de raíces tratadas con factores Nod a una dilución 2×10^{-4} a los tiempos 15, 30, 45 min., 1, 3, 6 y 9 hrs. Para las raíces tratadas con IAA $10 \mu\text{M}$ se obtuvieron RNAs a los tiempos 30, 45 min., 1, 3, 6, 9, 12 y 15 hrs. Para el caso de NAA se obtuvieron RNAs a los tiempo 45 min., 1, 2, 3, 6, 9 y 12 hrs. (figura 12). También se obtuvieron RNAs de raíces tratadas utilizando como control sólo solución desauxinante colectando muestras a los tiempos 45 min., 1, 2, 3, 6, 9 y 12 hrs. El RNA de cada muestra fue utilizado de acuerdo a la técnica de northern para hibridar con la sonda GH3.

En la figura 12 podemos apreciar que en las muestras controles de raíces tratadas únicamente con solución desauxinante no se observa ninguna expresión de algún transcrito homólogo a la secuencia GH3 en ninguno de los tiempos probados (figura 12A). En muestras de raíces tratadas a diferentes tiempos con factores Nod tampoco se observa ninguna expresión de algún transcrito (fig. 12B). En muestras de raíces tratadas a diferentes tiempos con las hormonas NAA e IAA se detecta un mRNA homólogo a la secuencia GH3. Por una parte, la auxina sintética NAA induce el mRNA desde tiempos tempranos, es decir comienza a haber una inducción desde los 45 min. teniendo una máxima expresión a las 3 y 6 hrs. para después comenzar sensiblemente a disminuir hasta

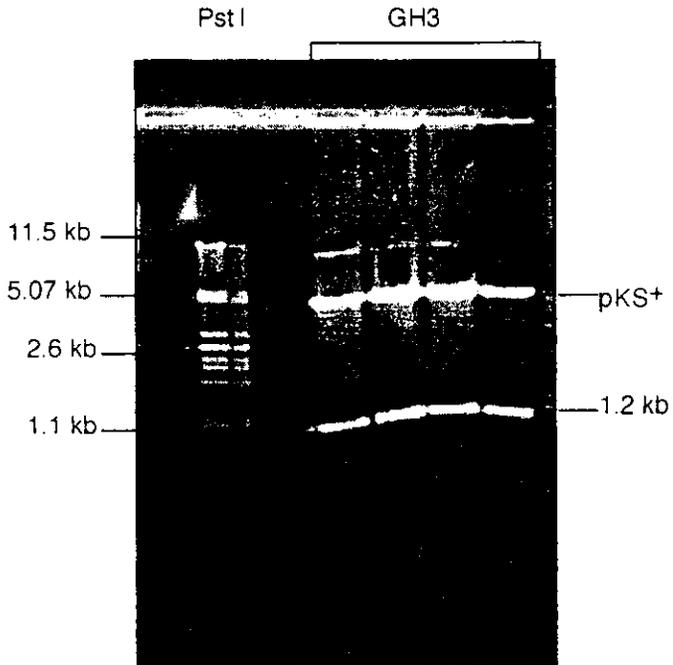


Fig. 11 Obtención de la secuencia GH3 (1.2 kb) clonada en el plásmido pKS⁺, digerida con 10U de la enzima de restricción EcoR1. En el primer carril se muestra el DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción Pst I.

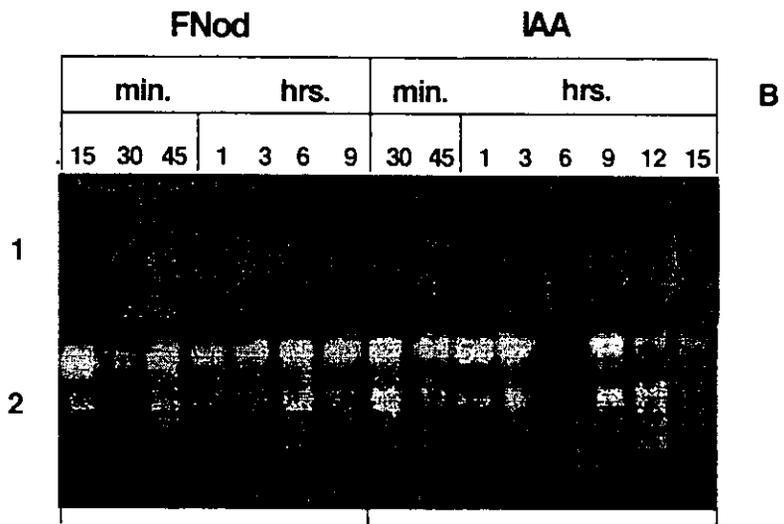
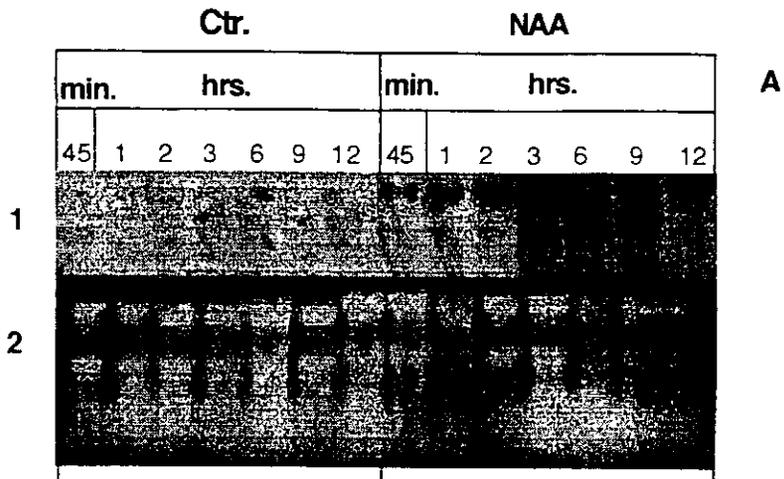


Fig.12 Hibridación tipo northern de muestras de RNA total de raíces de *Phaseolus vulgaris* L. contra la sonda GH3 (1.2 kb) obtenida de la planta de soya. Los tratamientos indican: Crt.: usando únicamente solución desauxinante; NAA: ácido naftalenacético 10 μ M; FNod: factores Nod obtenidos de un extracto butanólico de la cepa *R. t* CIAT899, 2×10^{-4} ; IAA: ácido indolacético 10 μ M. Los primeros paneles muestran la hibridación con la sonda y los segundos muestran los RNAs ribosómicos teñidos con bromuro de etidio.

las 12 hrs. Por otra parte, la auxina natural IAA induce el mismo mRNA a tiempos ligeramente tardíos, es decir la inducción se alcanza a apreciar a partir de las 3 hr., teniendo una inducción máxima a las 9 hrs. detectándose un segundo pico de inducción a las 15 hrs. Con este experimento se demuestra que el sistema utilizado para la inducción de la secuencia R_1O_1 es confiable ya que dicha solución desauxinante utilizada para estos experimentos disminuye la poza endógena de auxinas. Por otro lado también demostramos que *P. vulgaris* posee un mRNA homólogo a GH3 de soya. Por último, encontramos que este gen en frijol no se induce por factores Nod siendo un gen homólogo con el detectado en hipocotilo de soya y diferente al gen de aprox. 2.0 kb obtenido en este laboratorio.

DISCUSION

Una estrategia para estudiar procesos biológicos tales como respuesta a estrés (temperatura control vs. temperatura extrema), estadios de desarrollo (hifas vs. esporas), cáncer (célula normal vs. célula cancerosa), etc. consiste en analizar genes que se expresan en una condición estando ausentes en la otra. Recientemente se ha desarrollado la técnica de despliegue diferencial de RNAs mensajeros para detectar genes que se inducen específicamente en el proceso biológico a estudiar. Dado el interés de estudiar el proceso de morfogénesis de nódulos en plantas leguminosas decidimos utilizar la técnica de despliegue diferencial para aislar genes inducibles por auxinas y factores de nodulación ya que estos compuestos están involucrados en la formación del nódulo. Dicha técnica para aislar secuencias que se inducen ante ciertos tratamientos tiene sus ventajas y sus desventajas. Por un lado, es una técnica muy útil, rápida y práctica de utilizar ya que tan sólo con obtener el cDNA a partir del mRNA se deja a un lado los rRNA y los tRNA que se encuentran en gran cantidad. La síntesis de cDNA se logra utilizando el oligo Poli T₁₁ con algunas bases nitrogenadas al azar. La utilización de estas bases nitrogenadas es con el fin de obtener un menor número de mensajeros de la gran cantidad que hay. La amplificación de este cDNA se lleva a cabo usando oligos como el OPR y el mismo poli T₁₁ marcados radiactivamente. El OPR usado también al azar nos permite seleccionar aquellos cDNA que se unan a la secuencia del OPR para ser amplificados por PRC y así obtener un alto número de copias de cada uno y que al ser corridos en el gel de secuencia pueda observarse una placa más o menos limpia donde se puedan ver bandas separadas para ser estudiadas. Sin embargo, algunas desventajas que presenta esta técnica es que sólo se logra amplificar una población de mensajeros determinados por los oligos Poli T₁₁CA y OPR₁ de todo el mRNA que se encuentra en las células de la raíz. Esto es debido a que sólo utilizamos el oligo Poli T₁₁CA para sintetizar cDNA de aquellos RNAs mensajeros que tuvieran en su extremo 3'-OH el poli AGU sin sintetizar aquellos que tuvieran en su extremo 3'-OH las otras pares de bases terminales. El hecho de utilizar el oligo Poli T₁₁CA restringe la amplificación a una parte de la población posible de RNAs mensajeros que se unen a este par de bases; aunque es todavía muy grande la cantidad de cDNA amplificados quizá su variabilidad ya no es tan amplia. Así también al utilizar el oligo OPR₁ junto con el Poli T₁₁CA se redujo un poco más la amplificación de estos cDNA, por PCR. Sin embargo, al revelar la placa del gel observamos una gran cantidad de secuencias pero sólo pocas secuencias de DNA se inducían por factores Nod y auxinas estando ausentes en el control. Esto es debido a que muchas de estas bandas no se definen bien mientras que algunas otras están sobrelapadas (V. figura 5). No obstante a esto, logramos distinguir

claramente dos bandas de 170 pb y 200 pb que llamamos $T_{11CA}R_1O_1$ y $T_{11CA}R_1O_2$ respectivamente.

Dadas las limitaciones de esta técnica decidimos verificar la inducción de estas secuencias por factores Nod y auxinas mediante experimentos tipo northern. En el primer experimento realizado utilizando dicha técnica sólo el transcrito homólogo a la secuencia de 170 pb (R_1O_1) se expresó por factores Nod y auxinas, mientras que con la secuencia de 200 pb no hubo diferencias entre los tratamientos y el control por lo cual se descartó. La migración del transcrito al cual llamamos R_1O_1 se dio entre el ribosomal mayor 28S y el ribosomal menor 18S que fueron utilizados como marcadores internos. Esto nos permitió calcular aproximadamente el tamaño de este transcrito el cual es de 2.0 kb aprox. Es importante también porque nos permite predecir de una manera aproximada el tamaño de la proteína y el tamaño de la clona de cDNA para ser buscada en un banco de cDNA.

En el segundo northern (figura 8) hay una ligera inducción del transcrito R_1O_1 por factores Nod entre las 3 y las 15 hrs., observándose una inducción más clara ante auxinas entre las 12 y las 15 hrs. En los paneles inferiores se pueden observar los RNA ribosómicos, indicando la misma cantidad de RNA total cargada por carril.

En el tercer northern obtenido (figura 9) se puede apreciar que los factores Nod inducen al transcrito R_1O_1 a todo lo largo de los tiempos probados e incluso podría ser durante más tiempo. Esto podría deberse quizá a que este gen tenga un papel importante durante el desarrollo de la planta y se mantenga inducido por los factores Nod que podrían actuar como auxinas. Por otro lado, el transcrito R_1O_1 se induce por NAA e IAA observándose ligeros picos de inducción.

Para determinar desde que momento comenzaba a inducirse el transcrito exploramos tiempos más cortos. En la figura 10 podemos observar que el transcrito R_1O_1 se induce desde los 30 min. y se mantiene inducido durante todo el tiempo ante factores Nod, mientras que con NAA se induce a partir de los 15 min. y con IAA, el transcrito R_1O_1 comienza a inducirse a partir de los 30 min. Aunque podemos apreciar que el transcrito R_1O_1 se induce más por auxinas que por factores Nod no sabemos el tiempo exacto de mayor inducción por IAA o NAA pero sí podemos ver una inducción más temprana por NAA que por IAA; esto podría deberse a que la hormona sintética se transporta más rápido.

Aunque la secuencia $T_{11CA}R_1O_1$ la obtuvimos de muestras tratadas durante 15 hrs. con factores Nod y auxinas, podríamos inferir de acuerdo a los resultados obtenidos que la inducción de la parte del gen que aislamos y que podría tener una función durante la organogénesis del nódulo, se induce por auxinas y mantiene su inducción por tiempo prolongado con factores Nod. Una posible explicación del porqué el transcrito se induce de una manera diferente con auxinas y con factores Nod podría estar en su región regulatoria que modifique su respuesta ante distintos inductores. Se ha demostrado que hay genes que responden de diferente forma en presencia de uno u otro inductor. Por ejemplo, el gen que codifica para el gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se induce por calor, cambios en el metabolismo del carbono y por estrés osmótico, por lo cual tiene varias secuencias en su región regulatoria que responden ante uno u otro estímulo. Los factores Nod son más específicos en la nodulación y sólo ciertas células responden ante ellos, mientras que la mayoría de las células tienen la capacidad de responder ante auxinas. Así, el número de células expresando R_1O_1 en presencia de factores Nod podría ser menor que cuando se añaden auxinas exógenas detectándose más transcrito en esta última condición.

En los controles usando el extracto de la cepa RSP900 hemos descartado que el transcrito R_1O_1 se pudiera estar expresando por residuos que quedan en el extracto butanólico tales como LPS y EPS, ya que se ha demostrado que estos polisacáridos son inductores de genes para fitoalexinas y flavonoides donde estos productos codificados actúan como defensa de la planta. Por ejemplo el gen que codifica para la chalcona sintasa, que es inducido por las paredes celulares de agentes extraños, participa en la síntesis de compuestos fenólicos tales como los flavonoides que inhiben el transporte de auxinas. De esta manera, utilizando el extracto de la cepa RSP900 curada del plásmido simbiótico evitamos la confusión de aislar un gen de defensa. En otros controles utilizando únicamente solución desauxinante podemos ver que en los experimentos tipo northern hay una expresión mínima del transcrito. Esto puede ser debido a varias causas: a) que no llegan a salir por difusión completamente las auxinas de la raíz al ser diluidas en el medio desauxinante porque éste se sature; b) la solución desauxinante no disminuye en absoluto la poza endógena de auxinas; c) las condiciones de hibridación no hayan sido suficientemente estrictas por lo cual pudiera haber una hibridación cruzada. Para comprobar que nuestro sistema de incubación de buffer fosfatos disminuye la poza endógena de auxinas se hicieron los experimentos de la figura 12. Hemos demostrado que la secuencia GH3 de hipocotilo de soya que se induce por auxinas, al ser hibridada con el mRNA de raíces de la planta de frijol tratadas con

factores Nod, NAA e IAA, se observa una inducción de un transcrito homólogo a la secuencia GH3 de 1.2 kb en muestras de raíces tratadas con auxinas y no observamos ninguna inducción de este mRNA ante muestras tratadas con factores Nod ni en muestras controles tratadas con sólo solución desauxinante. Esto demuestra que nuestro medio funciona adecuadamente por lo que es poco probable que el transcrito detectado en los controles sea debido a la presencia de hormonas endógenas durante el tratamiento. Asimismo este experimento demuestra la presencia de un gen homólogo a GH3 en *P. vulgaris* y que es diferente al que se obtuvo en este laboratorio.

Una posible explicación a la expresión mínima del transcrito que se observa en los controles es que haya una hibridación cruzada con mensajeros similares al transcrito R_1O_1 . El Dr. Marco Aurelio Pardo realizó experimentos posteriores utilizando como sonda la secuencia $T_{11CA}R_1O_1$ hibridándola contra un banco de cDNA de nódulo maduro para tratar de obtener la secuencia completa del transcrito primario. De aquí obtuvo tres clonas que las llamó MAR_1 , MAR_2 y MAR_3 . El Dr. Pardo secuenció las 3 clonas obtenidas y encontró una gran homología entre ellas incluyendo un sitio de unión a mononucleótidos. Este hecho hace pensar que la hibridación detectada en los controles es debido a esta homología. Para probar esta hipótesis el Dr. Pardo llevó a cabo experimentos tipo northern usando condiciones de hibridación más estrictas que las usadas en este trabajo demostrando así que efectivamente no se detecta señal en los controles bajo estas condiciones de hibridación. Las tres clonas hibridan con sus mRNA a la misma altura, pero al hacer lavados más estrictos se desprenden las clonas MAR_2 y MAR_3 mostrándose únicamente la hibridación de MAR_1 con el transcrito homólogo R_1O_1 que se induce por factores Nod y auxinas. La MAR_1 la está secuenciando y analizando en el Gene Bank y parece ser que su secuencia nucleotídica tiene un dominio de carboxi terminal de una cinasa que comúnmente son asociadas a receptores.

Si la clona MAR_1 codifica para un receptor de membrana se debería de esperar que este receptor se apagara en un periodo corto ya que se ha visto en otros sistemas de transducción de señales que estos genes son transitorios. Una señal que dispara la organogénesis no debe mantenerse mucho tiempo debido a que la división celular se detiene en algún momento ya que de no ser así podría haber un desajuste en el metabolismo de la célula. Por ejemplo, las nodulinas tempranas se expresan durante varios días pero después se apagan. Experimentos que podrían llevarse a cabo es utilizando periodos más largos para monitorear en qué momento disminuye la inducción de este gen por factores Nod y hormonas. Esto sólo se podría realizar utilizando otro

sistema de incubación donde se mantuvieran las raíces en perfectas condiciones; uno de ellos podría ser mediante la técnica de hidroponía. Asimismo terminar de secuenciar el gen R_1O_1 , determinar su regulación, codificación, función, localización a nivel de raíz y el papel de algunos factores Nod individuales para probar si este gen está involucrado en la formación de los nódulos de la planta de *P. vulgaris*.

Hasta la fecha se han aislado muy pocos receptores a hormonas vegetales lo cual hace de este proyecto algo novedoso para estudiar.

Conclusión

Los experimentos realizados en este laboratorio demuestran que el transcrito R_1O_1 homólogo a la secuencia $T_{11CA}R_1O_1$ obtenida por muestreo diferencial, es inducido por NAA e IAA a una concentración $10\mu M$ y mantiene su inducción por tiempo prolongado por factores Nod a una dilución 2×10^{-4} en muestras de raíces de *Phaseolus vulgaris* L.

El transcrito R_1O_1 que es inducido por factores Nod, NAA e IAA tiene un peso molecular de aprox. 2.0 kb y parece estar involucrado en la organogénesis del nódulo en la planta de *P. vulgaris*.

Los factores Nod y las auxinas tienen un papel importante durante la formación y el crecimiento de los nódulos, activando y desactivando genes, bajo ciertas concentraciones y a un tiempo determinado.

La técnica de Despliegue Diferencial tiene sus ventajas y sus desventajas ya que si por un lado es práctica y fácil de usar, por otro lado no es tan sensible para obtener secuencias que se expresen ante ciertos tratamientos; sin embargo la inducción de sus transcritos puede ser comprobada mediante la técnica de northern blot.

La técnica de northern sirve como una herramienta para comprobar secuencias inducidas por ciertos tratamientos, a diferentes tiempos y concentraciones.

Experimentos tipo northern usando la secuencia GH3 inducible por auxinas demostraron que el medio desauxinante sí disminuye la poza endógena de auxinas de las raíces de la planta de frijol, detectándose además un transcrito homólogo a la secuencia GH3 obtenido en hipocotilo de soya y siendo diferente al transcrito estudiado en este laboratorio.

Bibliografía

Abel, S., Nguyen, M. D. and Theologis, A. 1995. The ps-IAA 4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.* 251: 533-549.

Abeles, F. B., Morgan, P. W. and Saltveit, M. E. 1992. Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York.

Appleby, C. A. 1984. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 443-478.

Baluska, F., Parker, J. S. and Barlow P. W. 1993. A role for gibberellic acid in orienting microtubules and regulation cell growth polarity in the maize root cortex. *Plant.* 191: 149-157.

Beringer, J. E. 1974. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of general Microbiology.* 120: 421-429.

Bidwell, R. G. S. 1979. Fisiología vegetal. AGT editor. México, D. F. pp. 529-625.

Bloemberg, G. V., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J., Spaink, H. P. 1994. Nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum* O-acetylates lipo-oligosaccharides, chitin fragments and N-acetylglucosamine *in vitro*. *Mol. Microbiol.* 11: 793-804.

Brobohaty, B., Ian, M. and Plame, K. 1994. Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* 26: 1483-1497.

Chen, H-H, Li, P. H., Brenner, M. L. 1983. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant. Physiol.* 71: 362-365.

Claes, B., Smalle, J., Dekeyser, R., Van Montagu, M., Caplan, A. 1991. Organ-dependent regulation of a plant promoter isolated from rice by promoter-trapping in tobacco. *Plant J.* 1: 15-26.

Cullimore, J. V., Gebhardt, C., Saarclainen, R., Hiflin, B. J., Idler, K. B. and Barker, R. F. 1984. Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L. Organ-specific expression of a multigene family. *J. Mol. Appl. Genet.* 2: 589-599.

- Davis, E. O. and Johnston, A. W. B. 1990. Regulatory functions of three *nodD* genes of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Molecular Microbiology*. 3: 1567-1577.
- deJong, A. J., Heidstra, R., Spaank, H. P., Hartog, M. V., Meijer, E. A., Hendriks, T., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Bisseling, T., van Kamen, A. and de Vries, S. C. 1993. Rhizobium Lipooligosaccharides Rescue a Carrot Somatic Embryo Mutant. *Plant Cell*. 5: 615-620.
- Delwiche, C. C. 1970. The nitrogen cycle. *Scientific American*. 223(3): 136-146.
- Delwiche, C. C. 1981. The cycle of Nitrogen and Nitrous Oxide. John Willey y sons, Inc. 1-15.
- Dénarié, J., Debelle, F. and Rosenberg, C. 1992. *Annual Review of Microbiology*. 46: 497-531.
- Ditta, G. S., Schmidhauser, T., Yacobson, E., Lu, P., Liang, X. W., Finlay, D. R., Guiney, D., and Helinski, D. R. 1980. Plasmid related to the broad host ranger vector, pRK290, useful for gene cloning and monitoring gene expression. *Plasmid*. 13: 149-153.
- Downie, J. A. and Surin, B. P. 1990. Either of two *nod* gene loci can complement the nodulation defect of a *nod* deletion mutant of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Molec. Gen. Genet*. 222: 81-86.
- Downie, J. A., Sutton, J. M. and Lea, E. J. A. 1992, NodO: a nodulation protein that forms pores in membranes. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. Seattle Washington, USA. 11-16 July. 1992.
- Economuo, A. and Downie, J. A. 1992. The nodulation of legumes by Rhizobia. In: *Nitrogen Fixation and its Research in China*, ed Hong Kong, G. F. pp. 315-339. Berlin and Heiselberg: Springer Verlag.
- Evans, I. J. and Downie, J. A. 1986. The *nodI* gene product of *R. leguminosarum* is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the *nodI* and *nodJ* genes. *Gene* 43: 95-101.
- Fischer, M. H. 1994. Genetic Regulation of nitrogen Fixation in Rhizobia. *Microbiological Reviews*. 58(3): 352-386.

Folch-Mallol, J. L., Marroquí, S., Sousa, C., Manyani, H., López-Lara, I. M., van der Drift, G. M., Haverkamp, J., Quinto, C., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Spaink, H. P. and Megías, M. 1996. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 Nodulation Factors: The Role of *nodH* and *nodPQ* Genes in Their Sulfation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(3): 151-163.

Franssen, H. J., Vign, I., Yang, W. C. and Bisseling, T. 1992. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 19: 89-107.

Gillaspy, G., Ben-David, H., Gruissem, W. 1993. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell.* 5: 1439-1451.

Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P. C., Durand, B. M. and Vartanian, N. 1994. Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol. Biol.* 26: 1557-1577.

Goodwin, B. C. and Cohen, M. H. 1969. A phase-shift model for the spatial and temporal organization of developing system. *J. Theor. Biol.* 25: 49-107

Guilfoyle, T. J., Lin, C. Y., Chen, Y. M., Nagao, R. T., Key, J. L. 1975. Enhancement of soybean RNA polymerase I by auxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72: 69-72.

Györgypal, Z., Iyer, N. and Kondorosi, A. 1988. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid specificity are involved in host-dependent nodulation by *R. meliloti*. *Molecular and General Genetics.* 212: 85-92.

Hagen, G., Kleinschmidt, A. and Guilfoyle, T. J. 1984. Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta.* 162: 147-153.

Heidstra, R. and Bisseling, T. 1996. Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytol.* 133: 23-43.

Hense, C. E., Meins, F. Jr., Milani, A. 1985. Clonal and physiological variation in the cytokinin content of tobacco cell lines differing in cytokinin requirements and capacity for neoplastic growth. *Differentiation.* 29: 1-6.

Hisch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 22: 211-237.

Hooley, R. 1994. Gibberellins: Perception, transduction and responses. *Plant Mol. Biol.* 26: 1529-1555.

Hughes, D. W., Gaubier, P., Delseny, M., Casse-Delbart, F. 1993. Abscisic acid inducible genes and their regulation in higher plants. *Current Top. Mol. Genet.* 1: 289-305.

Johnston, A. W. B., Benynon, J. L., Buchanan-Wollaston, A. V., Setchell, S. M., Hirsch, P. R. and Beringer, J. E. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature.* 276: 634-636.

Journet E. P., Pichon, M., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G., Barker, D. G. 1994. *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant Journal.* 6: 241-249.

Kelly, M. O., Bradford, K. J. 1986. Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. *Plant. Physiol.* 82: 713-717.

Key, J. L. 1969. Hormones and nucleic acid metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 20: 449-474.

Kijne, J. W. 1991. The infection process. In: *Biological Nitrogen Fixation*. G. Stracey, R. H. Burris and H. J. Evans (eds.) Chapman and Hall. New York, London.

Kondorosi, E., Banfalvi, Z. and Kondorosi, A. 1984. Physical and genetical analysis of symbiotic region of *R. meliloti*: identification of nodulation genes. *Molecular and General Genetics.* 193: 445-452.

Kondorosi, A. and Johnston, A. W. B. 1981. The genetics of *Rhizobium*. *Trends. Biochem. Sci.* 11: 296-299.

Lehninger, L. A. 1982. *Biochemistry*; 2a. edition; Worth publishers; New York, USA. Inc. 1104 pp.

Leigh, J. A., Singner, E. R. and Walker, G. C. 1985. Exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA.* 82: 6231-6235.

Layzell, B. D. and Hunt, S. 1990. Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiologia Plantarum.* 80: 322-327.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. and Dénarié, J. 1990. Symbiotic host specificity of *R. meliloti* is determined by 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.

Long S. R. 1992. Expression and action of *Rhizobium nod* genes; recent results. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. Seattle, Washington, USA. 11-16 July.

Maillet, F., Debellé, F. and Dénarié, J. 1990. Role of the *nodD* and *syrM* genes in the activation of the regulatory *nodD3* and the common and host specific *nod* genes of *R. meliloti*. *Molecular Microbiology*. 4: 1975-1984.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Martin, C. and Gerats, T. 1993. Control of pigment biosynthesis genes during petal development. *Plant Cell*. 5: 1253-1264.

Martínez, E., Pardo, M. A. Palacios, R. and Ceballos, M. A. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of General Microbiology*. 131: 1779-1786.

Megías, M., Folch, J. L. and Sousa, C. 1993. Control of the expression of bacterial genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. 9: 444-454.

Mylona, P., Pawlowski, K. and Bisseling, T. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation *The Plant Cell*. 7: 869-885.

Nguyen, T., Zelechowska, M., Foster, V., Bergmann, H. and Verma, D. P. S. 1985. Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 5040-5044.

Nuti, M. P., Lepidi, A. A., Prakash, P. K., Schilperoot, R. A. and Cannon, F. C. 1979. Evidence for nitrogen fixation genes on indigenous *Rhizobium* plasmids. *Nature*. 282: 533-535.

Oelles, P. W., Wong, L. M., Taylor, L. P., Pike, D. A., Theologis, A. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*. 254: 437-439.

Patterson, R. D. and Trewavas, A. J. 1967. Changes in the pattern of protein synthesis induced by 3-indolylacetic acid. *Plant. Physiol.* 42: 1081- 1086.

Roche, P., Debellé, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Dénarié, J. and Promé, J. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell*. 67:1131-1143.

Rodríguez-Quiñones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P. and Kondorosi, A. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant Mol. Biol.* 8: 61-67.

Röhrig, H., Schmidt, J., Walden, R., Czaja, I., Miklasevics, E., Wieneke, U., Schell, J. and John, M. 1995. Growth of tobacco protoplasts stimulated by synthetic lipo-chitooligosaccharides. *Science*. 269; 841-843.

Ronson, C. W., Nixon, B. T. and Ausubel, F. M. 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to the environment stimuli. *Cell*. 49: 579-581.

Scheres, B., van de Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaik, H., van Eck, H., Zwartkuis, F., Welters, A. M., Gloudemans, T., van Kammen, A. and Bisseling, T. 1990a. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell*. 60: 281-294.

Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virilizier, H., Glushka, J. N., Gero, S. D. and Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 89: 192-196.

Smit, G., Kinje, J. W. and Lugtenberg, B. J. J. 1987. Involvement of both cellulose fibrils and Ca_2^+ -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *Journal of Bacteriology*. 169: 4294-4301.

Smit, G., de Koster, C. C., Schripsema, J., Spaik, H. P., van Brussel, A. A. N. and Kinje, J. W. 1995. Uridine, a cell division factor in pea roots. *Plant. Mol. Biol.* 29: 869-897.

Spaink, H. P., Okker, R. J. H., Wijffelman, C. A., Tak, T., Goosen de Roo, L., Pees, E., van Brussel, A. A. N. and Lugtenberg, B. J. J. 1989. Symbiotic properties of Rhizobia containing a flavonoid independent hybrid *nodD* product. Journal of Bacteriology. 171: 4045-4053.

Spaink, H. P., Weinman, J., Djordjevic, M. A., Wijffelman, C. A., Okker, R. J. H. and Lugtenberg, B. J. J. 1989. Genetic analysis and cellular localization of the *Rhizobium* host specificity-determining Nod E protein. EMBO J. 8: 2811-2818.

Spaink, H. P. 1995. The molecular basis of infection and nodulation by Rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 354-368.

Spaink, H. P. 1996. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. Critical Reviews in Plant Sciences. 15(6): 559-582.

Spaink, H. P., Bloemberg, G. V., Wijfjes, A. H. M., Ritsema, T., Geiger, O., López-Lara, I. M., Hartevelde, M., Kafetzopoulos, D., van Brussel, A. A. N., Kijne, J. W., Lugtenberg, B. J. J., van der Drift, K. M. G. M. and Sautter, C. 1994a. The molecular basis of host-specificity in the *Rhizobium leguminosarum*-plant interaction. In: advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. 3: 91-98.

Theologis, A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. Cell. 70: 181-184.

Truchet, G., Barker, D. G., Camut, S., de Billy, F., Vasse, J. and Huguet, T. 1989. Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. Mol. Gen. Genet. 219: 65-68.

Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J. C. and Dénarié, J. 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. Nature. 351: 670-673.

Thummler, F. and Verma, D. P. S. 1987. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodule. J. Biol. Chem. 262: 14730-14736.

Ulmasov, T., Liu, Z. B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. 1995. Composite structure of auxin response elements. Plant Cell. 7: 1611-1623.

Van de Sande, K., Pawlowski, K., Czaja, I., Wieneke, U., Schell, J., Schmidt, J., Franssen, H. and Bisseling, T. 1996. Modification of Phytohormone Response by a Peptide Encoded by ENOD40 of Legumes and a Nonlegume. *Science*. 273: 370-373.

Van de wiel, C., Scheres, B., Frassen, H., van Lierop, M. J., van Lammeren, A., van Kammer, A. and Bisseling, T. 1990. The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule perenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J*. 9: 1-7.

Van Den Eede, G., Dreyfus, B., Goethals, K., Montagu, V. M. and Holsters, M. 1987. Identification and cloning of nodulation genes from stem nodulating bacterium ORS571. *Molecular and General Genetic*. 206: 291-299.

Vanderhoef, L. N. and Stahl, C. A. 1975. Separation of two responses to auxins by means of cytokinin inhibition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 72(5): 1822-1825.

Vargas, C., Martínez, L. J., Megías, M. and Quinto, C. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host range *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CIAT899. *Molecular Microbiology*. 4: 1899-1910.

Vázquez, M., Santana, O., Villalobos, M. A. and Quinto, C. 1992. Similarity of the nodI and nodJ products with protein from gramnegative bacteria. Organization and function of nodulation genes related sequences in *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CE3. In 6th International Symposium on the Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions. Seattle, Washington, USA. 11-16 July. 1992.

Young, J. P. W. and Johnston, A. W. B. 1989. The evolution of specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Tree*. 4: 341-349.

Zarembinski, T. I. and Theologis, A. 1994. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol. Biol*. 26: 1579-1597.