



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Biotecnología

Departamento de Biología Molecular de Plantas

**EXPRESIÓN A TIEMPOS CORTOS DEL GEN DE LA
PEROXIDASA *rip1* DE *Phaseolus vulgaris* EN PRESENCIA DE
FACTORES NOD**

Que para obtener el título de Maestría en Ciencias Bioquímicas

Presenta:

Jesús Montiel González

bajo la asesoría de la

Dra. Carmen Quinto Hernández

Agosto/2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



Esta tesis fue realizada en el Instituto de biotecnología/UNAM en el departamento de biología molecular de plantas en el laboratorio a cargo de los Drs. Carmen Quinto Hernández y Federico Sánchez Rodríguez, bajo la asesoría de la Dra. Carmen Quinto Hernández y con el apoyo becario de CONACyT.

**Esta tesis se la dedico a mi mamá,
Maribel González Montiel, a mi abuelo
Benjamín González Martínez y
especialmente a mi abuela Lucila Montiel
Rosete (†).**

**Agradezco a todos los integrantes
de los laboratorios del Dr. Federico
Sánchez y la Dra. Carmen Quinto,
en especial a las biólogas Noreide
Nava y Olivia Santana.**

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	2
	-Simbiosis Rhizobia-Leguminosa	2
	-Intercambio de señales durante la simbiosis	3
	-Factores de Nodulación y el proceso simbiótico a nivel celular	4
II.	ANTECEDENTES	7
	-Respuestas a nivel molecular inducidas por los factores Nod en las raíces de las leguminosas	7
	-Nodulinas Tempranas	8
	-Especies de Oxígeno Reactivas (EOR)	8
	-Peroxidasas	11
	-EOR y su regulación durante la simbiosis <i>R. etli-P. vulgaris</i>	14
	-Aislamiento del cADN <i>Pvrip1</i>	17
III.	HIPOTESIS	19
IV.	OBJETIVOS	19
	-Objetivo General	19
	-Objetivos Particulares	19
V.	MATERIAL Y METODOS	21
	-Ensayo tipo <i>Southern</i>	22
	-Germinación de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> variedad Negro Jamapa)	23
	-Aplicación de los diferentes tratamientos a las raíces	24
	-Ensayo tipo <i>Northern</i>	25
	-Ensayos de RT-PCR	28
	-Hibridación <i>in situ</i>	29
VI.	RESULTADOS	33
	-Análisis <i>in silico</i> del transcrito <i>Pvrip1</i>	33
	-Número de copias de <i>Pvrip1</i> en el genoma de frijol	38
	-Localización del transcrito <i>Pvrip1</i> en las raíces de frijol	38
	-Acumulación del transcrito <i>Pvrip1</i> en respuesta a diferentes tratamientos	39
VII.	DISCUSION	44
VIII.	CONCLUSIONES	49
IX.	PERSPECTIVAS	49
X.	LITERATURA CITADA	50

INTRODUCCIÓN

- **Simbiosis Rhizobia-leguminosa**
- **Intercambio de señales durante la simbiosis**
- **Factores de nodulación y el proceso simbiótico a nivel celular**

I. INTRODUCCIÓN

SIMBIOSIS RHIZOBIA-LEGUMINOSA

En la naturaleza existen diversas interacciones entre los seres vivos, una de ellas es la simbiosis, en la cual dos organismos de diferentes especies se benefician de esta relación. Una de las interacciones simbióticas más importantes y estudiadas, es la establecida entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las raíces de las plantas leguminosas. En las raíces de la planta se forman nuevas estructuras denominadas nódulos en las cuales el microsimbionte lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Atlas y Bartha, 1998). Debido a esta simbiosis, la planta es provista de una fuente asimilable de nitrógeno (amonio), para llevar a cabo la síntesis de compuestos nitrogenados y las bacterias a su vez reciben fuentes de carbono, necesarias para su crecimiento. Este mecanismo es de suma importancia para el hombre, ya que las leguminosas son de gran interés agronómico, siendo el frijol la leguminosa de mayor consumo directo por el hombre (Brock y Madigan, 1989).

Dentro de los géneros de bacterias que llevan a cabo el proceso simbiótico de fijación de nitrógeno con las plantas leguminosas se encuentran: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, los cuales colectivamente son denominados Rhizobia (revisado en Perret *et al.*, 2000).

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, la cual es realizada por los rhizobios, gracias a que poseen un sistema enzimático, el de la nitrogenasa. Este complejo está compuesto por la nitrogenasa (proteína MoFe) y la nitrogenasa reductasa (proteína Fe). El complejo de la nitrogenasa es sensible de forma irreversible al O₂, aún cuando éste se encuentre a concentraciones muy bajas, es por ello que los niveles de oxígeno en el nódulo son finamente controlados, mediante la leghemoglobina, una proteína que captura el oxígeno a través del grupo hemo y es provista por la planta (Brock y Madigan, 1989).

INTERCAMBIO DE SEÑALES DURANTE LA SIMBIOSIS

El proceso simbiótico es altamente específico, y requiere de un intercambio de señales químicas entre ambos organismos. Por una parte, la planta libera constantemente a la rizósfera diversos compuestos, los cuales incluyen, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, amino ácidos y derivados fenólicos. Estos últimos son los que disparan el primer paso para la interacción simbiótica entre la bacteria y las raíces de las leguminosas (revisado en Perret *et al.*, 2000). Dentro de los compuestos fenólicos, específicamente los flavonoides y los isoflavonoides junto con las betaínas, los glucósidos y los ácidos aldónicos funcionan como quimioatrayentes de las bacterias, las cuales son atraídas hacia el ápice de los pelos radicales. Posteriormente estos compuestos interactúan específicamente con un regulador transcripcional bacteriano, la proteína Nod D, induciendo así la transcripción de los genes llamados “*nod*”. Los genes *nod* codifican proteínas que participan en la síntesis y secreción de metabolitos conocidos como “factores de nodulación” (Figura 1) (revisado en Geurts y Bisseling, 2002) que en respuesta a los flavonoides, constituyen la segunda señal en este intercambio químico. Se ha reportado, que en presencia de los rhizobios la liberación de éstos compuestos a la rizósfera se incrementa en los exudados radicales de las leguminosas (Bolaños y Werner, 1997) (Figura 1).

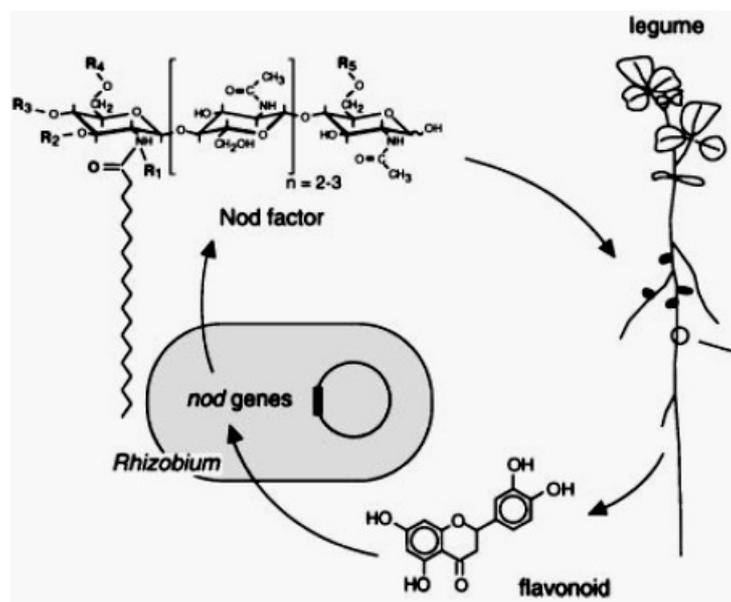


Figura 1. Esquema general del intercambio de señales en la simbiosis Rhizobia-leguminosa (revisado en Schultze y Kondorosi, 1998).

FACTORES DE NODULACION Y EL PROCESO SIMBIOTICO A NIVEL CELULAR

Los factores Nod son lipoquitooligosacáridos constituidos por un esqueleto de quitina, con cuatro o cinco unidades de *N*-acetilglucosamina, con modificaciones químicas en sus extremos reductor y no reductor, tales como ácidos grasos, glicosilaciones, sulfataciones, O-metilaciones y/o N-metilaciones (revisado en Gage, 2004). Estas modificaciones químicas, se llevan a cabo mediante la actividad enzimática de las proteínas codificadas por los genes *nod* (Corvera et al., 1999). La síntesis del esqueleto de los FNs está codificada por los genes que se conocen como *nod* comunes y son: *nodA*, *nodB* y *nodC*; el papel de *nodC* consiste en unir a los monómeros de *N*-acetil-glucosamina, el de *nodB*, en remover el grupo acetilo del extremo no reductor y el papel de *nodA* es el de transferir la cadena de ácido graso al grupo amino libre resultante de la desacetilación. Los genes *nod* llamados “específicos”, codifican para enzimas que modifican químicamente la molécula “señal”, adicionando diversos sustituyentes químicos que le dan la especificidad en su reconocimiento por la planta hospedera (Hirsch et al., 2001) (Figura 2).

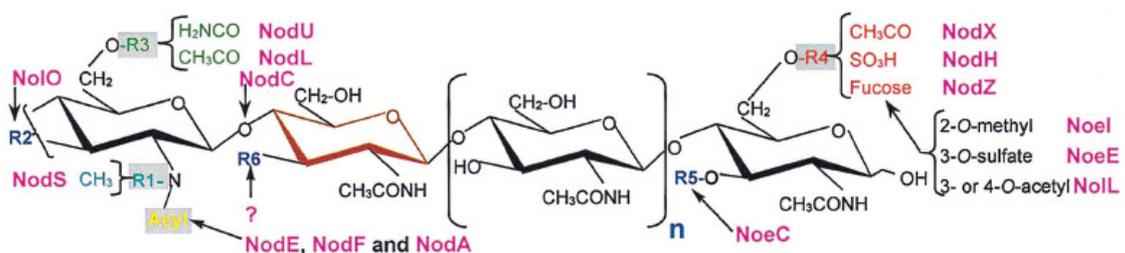


Figura 2. Estructura de los factores Nod con sus posibles modificaciones químicas (revisado en Perret et al., 2000).

El proceso simbiótico, requiere que se establezca una interacción física entre los simbiontes. Por una parte, las leguminosas presentan lectinas en la superficie de los pelos radicales, las cuales son proteínas de unión a sacáridos, y se ha demostrado que juegan un papel en el reconocimiento, adherencia e infección (Sreevidya et al., 2005). En cuanto a las bacterias, éstas presentan en su superficie exopolisacáridos, lipopolisacáridos, ricadesinas y fibrillas de celulosa, las cuales reconocen a las lectinas presentes en las leguminosas (Smit et al., 1989). Aunque la presencia de estos

compuestos no es determinante para el proceso de infección, éstos son necesarios para que dicho proceso se realice adecuadamente (Laus *et al.*, 2005).

Una vez establecida la interacción física entre ambos simbios, el microsimbionte genera diversos cambios a nivel celular en su hospedero. El primero de ellos es la deformación del pelo radical de la leguminosa, que consiste principalmente en un enroscamiento. Esta deformación va acompañada por la división de células del córtex y la inducción de las denominadas nodulinas, que son genes que incrementan su expresión durante el proceso simbiótico, como es el caso de ENOD40.

El enroscamiento del pelo radical permite la formación del hilo de infección, que consiste en una estructura tubular por la cual se internalizan las bacterias. Este proceso comienza con la hidrólisis de la pared celular en la región del enroscamiento, el cual es seguido por una invaginación de la membrana y la formación de nueva pared celular. Posteriormente, el hilo de infección va migrando hacia el interior del pelo radical, esta migración va dirigida por el núcleo del pelo; en este trayecto las bacterias se encuentran en proceso de división. Una vez que el hilo de infección se internaliza hasta las células del córtex, éste se ramifica y libera a las bacterias, las cuales ingresan al citoplasma de las células del córtex, envueltas por una membrana denominada peribacteroidal. Una vez que las bacterias se encuentran dentro del citoplasma, sufren un cambio a bacteroides, y es en estos donde se lleva a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio (revisado en Patriarca *et al.*, 2004) (Figura 3).

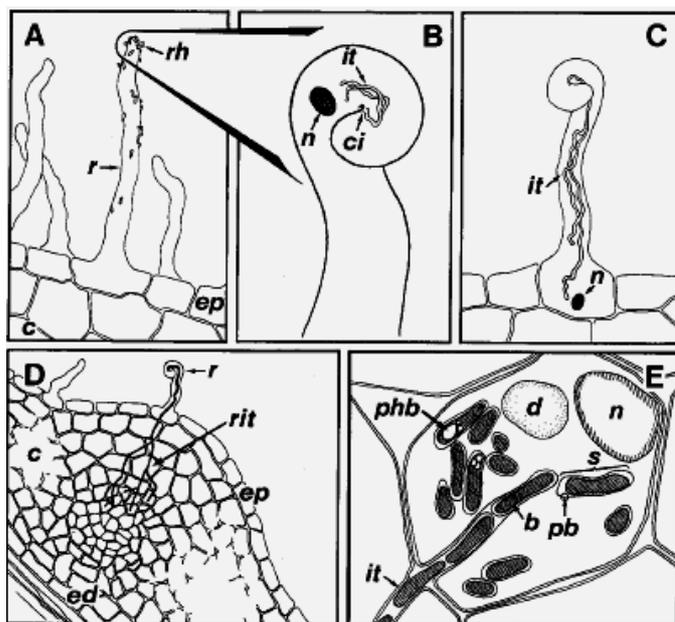


Figura 3. Esquema general de los procesos a nivel celular de la interacción Rhizobia-leguminosa. A) Adherencia de las rizobias (*rh*) a la región apical del pelo radical de la leguminosa. B) Inducción del enroscamiento del pelo radical en torno a la bacteria y formación del hilo de infección (*it*) en el centro de infección (*ci*). C) Migración del hilo de infección, precedida por el núcleo del pelo radical. D) Ramificación del hilo de infección (*rit*) en las células del córtex en división. E) Liberación de rizobias del hilo de infección y formación de simbiosomas. Acumulación de gránulos de polyβ – hidroxibutirato (*phb*) en el bacteroide (*b*), rodeado por la membrana peribacteroidal (*pb*). Abreviaciones: *c*; córtex, *d*; vacuola digestiva; *ep*; epidermis, *ed*; endodermis, (revisado en Perret *et al.*, 2000).

ANTECEDENTES

- **Respuestas a nivel molecular inducidas por los factores Nod en las raíces de las leguminosas**
- **Nodulinas tempranas**
- **Especies de Oxígeno Reactivas (EOR)**
- **Peroxidasas**
- **EOR y su regulación durante la simbiosis *R. etli*-*P.vulgaris***
- **Aislamiento del cADN *Pvrip1***

II. ANTECEDENTES

RESPUESTAS A NIVEL MOLECULAR INDUCIDAS POR LOS FACTORES NOD EN LAS RAICES DE LAS LEGUMINOSAS

En los pelos radicales de las leguminosas, diversos estudios han descrito las respuestas inducidas por los factores Nod a nivel molecular. El primer evento que ocurre, consiste en un aumento en el influjo de calcio extracelular en el pelo radical, lo cual conlleva a un incremento en la concentración de calcio intracelular, del orden de 4 veces, después de 5 min de exposición a los factores Nod de *R. etli* (Cárdenas *et al.*, 1999). El aumento en el influjo de calcio es seguido por un aumento en el eflujo de cloro y potasio en los pelos radicales de *M. sativa* (Felle *et al.*, 1998); este movimiento de iones, provoca la despolarización del potencial de membrana (Ehrhardt *et al.*, 1992). Este flujo de iones, así como la despolarización de la membrana, lleva a una alcalinización del citoplasma de pelos radicales de alfalfa (Felle *et al.*, 1996). Se ha reportado que hay oscilaciones en la concentración de calcio intracelular en la zona perinuclear de los pelos radicales de 10 a 15 min después de la exposición a los factores Nod específicos (Cárdenas *et al.*, 1999, Ehrhardt *et al.*, 1996). Estas fluctuaciones tienen un patrón específico, el cual es distinto en presencia de elicitores de oligómeros de quitina (Cárdenas *et al.*, 1999; revisado en Felle, 2000). Se ha demostrado además, que los pelos radicales de frijol tratados con factores Nod sintetizados por *R. etli*, presentan fragmentación y polimerización de los filamentos de actina (Cárdenas *et al.*, 1998). Los factores Nod también provocan una reorientación del crecimiento de los pelos radicales de *M. truncatula*, en la dirección en que éstos sean aplicados (Esseling *et al.*, 2003) Tabla 1.

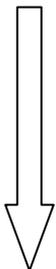
Tiempo	Efecto
	Incremento en el influjo de calcio en el ápice de los pelos radicales de frijol (Cárdenas <i>et al.</i> , 1999).
	Alcalinización del citoplasma de pelos radicales de alfalfa (Felle <i>et al.</i> , 1996; revisado en Cárdenas <i>et al.</i> , 2000).
	Movimiento de iones y despolarización del potencial de membrana de pelos radicales de alfalfa (Ehrhardt <i>et al.</i> , 1992).
	Incremento y fluctuaciones en la concentración de calcio en la zona perinuclear de pelos radicales de frijol (Cárdenas <i>et al.</i> , 2000).
	Fragmentación y polimerización de filamentos de actina de pelos radicales de frijol (Cárdenas <i>et al.</i> , 1998).
	Reorientación del crecimiento radical en raíces de <i>M. truncatula</i> (Esseling <i>et al.</i> , 2003).

Tabla 1. Eventos tempranos a nivel molecular en los pelos radicales de distintas leguminosas tratadas con factores de nodulación específicos.

NODULINAS TEMPRANAS

En el proceso de nodulación, los factores Nod purificados o la inoculación con los rizobios, inducen la transcripción de algunos genes de la planta. Las proteínas codificadas por estos genes, que son inducidas horas después de la inoculación con rizobios o del tratamiento con los factores Nod, son llamadas nodulinas tempranas. Dentro de estas nodulinas tempranas se encuentran *ENOD40*, *ENOD2*, *ENOD12* y *ENOD11*. La aplicación a la raíz de los factores Nod específicos, es suficiente generalmente para activar la transcripción de estas nodulinas, como *ENOD2* en *Glycine soja*, *ENOD11* en *M. truncatula* y *ENOD5* en *Vicia sativa* por mencionar algunas (revisado en Miklasheviks *et al.*, 2001). Es por esto, que las nodulinas se han considerado como marcadores moleculares excelentes para el estudio y caracterización de mutantes, toda vez que su expresión es un indicador de una vía de señalización activa. *ENOD40* es una de las nodulinas que se inducen tempranamente en el proceso de organogénesis del nódulo, esto es, desde las 3 hrs y 24 hrs después de la inoculación en *M. sativa* (Compaan *et al.*, 2001) en *L. japonicus* (Flementakis *et al.*, 2000) respectivamente.

ESPECIES DE OXIGENO REACTIVAS

Durante la formación del hilo de infección, así como durante el desarrollo del nódulo, se ha observado que ocurre una explosión oxidativa en el pelo radical, es decir, la generación de EOR (Especies de Oxígeno Reactivas) (Santos *et al.*, 2001). Estas especies son derivadas del O₂ y son más reactivas que éste en su estado basal de triplete; esto es, sus dos electrones ligantes poseen *spin* paralelos. Las principales EOR son las especies que son producto de la ruptura o de la excitación del O₂, es decir, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno en singulete, así como las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (revisado en Hansberg, 2002).

Las EOR son compuestos generados constantemente en organelos con alto metabolismo oxidativo o con un flujo intenso de electrones como son las mitocondrias y los cloroplastos de las células fotosintéticas (revisado en Mittler *et al.*, 2004). Los centros de reacción del fotosistema I y II de los cloroplastos, son los principales generadores de EOR, ya que la fotoreducción del oxígeno produce O₂⁻, el cual a su vez

puede ser reducido nuevamente y generar H₂O₂ (revisado en Asada, 2006). También se ha observado que existen mecanismos específicos para su generación, como son las NADPH oxidasas, las cuales son proteínas de membrana que llevan a cabo la reducción de oxígeno para generar superóxido, utilizando como agente reductor NADPH. Estas enzimas se encuentran reguladas por GTPasas, como las ROPS (Rho-related GTPases). Se ha observado que Rac2 es un regulador clave de las NADPH oxidasas (revisado en Laloi *et al.*, 2004).

Las EOR tienen diferentes funciones en las plantas: se ha observado que las células vegetales responden con una rápida explosión oxidativa a diversos estímulos tanto bióticos como abióticos. Tal es el caso en la respuesta hipersensible, inducida por la presencia de un patógeno (revisado en Lamb y Dixon, 1997). Además, se ha visto que las EOR participan en mecanismos de señalización, ya que el H₂O₂ en presencia de metales de transición favorece la disociación de las GTPasas de la superfamilia Ras (Heo y Campbell, 2006); asimismo se ha reportado la activación de canales de calcio en presencia de H₂O₂, siendo el calcio uno de los principales segundos mensajeros utilizados en mecanismos de señalización (revisado en Mori y Schroeder, 2004). En *A. thaliana* se ha demostrado que la presencia de H₂O₂ induce la expresión de *oxiI*, el cual codifica una serina/treonina cinasa, que lleva a cabo la activación de MPK3 y MPK6, que están involucradas en el crecimiento radical y la defensa ante patógenos (Rentel *et al.*, 2004). También en *A. thaliana* se activa AtNDPK2 (*Arabidopsis thaliana* Nucleotide Diphosphate Kinase2), la cual regula el estado redox de la célula, activando la expresión de genes antioxidantes, probablemente mediante una cascada de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) (revisado en Lalois *et al.*, 2004).

Durante el cierre de los estomas, se ha visto que tanto el ácido abscísico (ABA) como el metil jasmonato (MJ) inducen un incremento en la producción de EOR, provocando la activación de los canales de calcio (Suhita *et al.*, 2004) y este incremento en la producción de EOR se debe a la activación de dos NADPH oxidasas, AtrbohD y AtrbohF (Kwak *et al.*, 2003).

Por otra parte, Foreman *et al.* (2003) mediante estudios realizados en la mutante *root hair defective (rhd)* de *Arabidopsis*, cuyo fenotipo consiste en pelos radicales pequeños, demostraron que en la zona de crecimiento de los pelos radicales hay un incremento de EOR, las cuales son producidas por la actividad de una NADPH oxidasa. Comprobaron que las EOR son necesarias para regular el crecimiento celular en esta

zona ya que incrementan el influjo de calcio, debido a que activan a los canales de calcio.

La regulación de las EOR en la célula es de suma importancia, ya que si se encuentran en concentraciones elevadas pueden causar daño oxidativo a proteínas, lípidos y al ADN. Se ha demostrado que el radical superóxido inactiva a enzimas del ciclo de Krebs como la aconitasa y la ribonucleótido reductasa (requerida para la síntesis de ADN). Por otra parte, se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno puede inducir la inactivación de enzimas del ciclo de Calvin y de la leghemoglobina en los nódulos de las leguminosas (revisado en Matamoros *et al.*, 2003). Sin embargo, las especies más dañinas son el radical OH[·] y el ¹O₂, ya que los daños generados por éstos son irreversibles y en términos generales marcan a las proteínas para su degradación (revisado en Hansberg, 2002).

Las células vegetales presentan mecanismos específicos para la regulación de las EOR, siendo los más frecuentes el ciclo del glutatión-ascorbato, el de la glutatión peroxidasa y enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa (Tabla 2). Sin embargo también hay proteínas con características antioxidantes como las tioredoxinas, las peroxiredoxinas y las peroxidases de pared celular (revisado en Apel y Hirt, 2004).

Las tioredoxinas son inducidas considerablemente en plástidos en respuesta a estrés biótico y abiótico, donde catalizan la reducción de enlaces disulfuro. Por otra parte las peroxiredoxinas son reductasas dependientes de tioredoxina, que detoxifican sustratos de peróxido a través de un residuo cisteinil. Estas proteínas funcionan como chaperonas moleculares y como señalizadoras del estado oxidativo de la célula (revisado en Dos Santos y Rey, 2006). En cuanto a las peroxidases se ha reportado por ejemplo, que plantas de tomate con mayor tolerancia al estrés salino tienen una mayor actividad de estas enzimas, lo cual se ve reflejado en una disminución de la peroxidación de lípidos (Koca *et al.*, 2006).

Mecanismo	Enzima	Reacción
Superóxido Dismutasa	SOD	$O^{2-} \rightarrow H_2O_2$
Catalasa	CAT	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
Ciclo del Glutati6n-Ascorbato	APX	$H_2O_2 + \text{Ascorbato} \rightarrow H_2O + \text{MDA}$
	MDAR	$\text{MDA} + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{Ascorbato} + \text{NAD(P)}^+$
	DHAR	$\text{Dehidroascorbato} + \text{GSH} \rightarrow \text{Ascorbato} + \text{GSSG}$
	GR	$\text{GSSG} + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{GSH} + \text{NAD(P)}^+$
Ciclo del Glutati6n Peroxidasa	GPX	$H_2O_2 + \text{GSH} \rightarrow H_2O + \text{GSSG}$
	GR	$\text{GSSG} + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{GSH} + \text{NAD(P)}^+$

Tabla 2. Reacciones de los principales mecanismos enzimáticos empleados para detoxificar a la célula. SOD superóxido dismutasa, CAT catalasa, APX ascorbato peroxidasa, MDA monodehidroascorbato, MDAR monodehidroascorbato reductasa, DHAR dehidroascorbato reductasa, GSH glutati6n, GSSG glutati6n oxidado, GR glutati6n reductasa, GPX glutati6n peroxidasa.

PEROXIDASAS

Las peroxidasas son glicoproteínas que poseen un grupo hemo y catalizan reacciones de óxido-reducci6n de acuerdo a la siguiente ecuaci6n:



Estas proteínas incluyen dos superfamilias, una encontrada en bacterias, plantas y hongos, y la segunda en animales. La primera a su vez, se divide en 3 clases:

- Clase I: Incluye peroxidasas intracelulares como la citocromo-C peroxidasa de levadura (CCP), la ascorbato peroxidasa (AP) encontrada en cloroplastos y citosol de plantas superiores y las catalasas-peroxidasas en bacterias.
- Clase II: Consiste en peroxidasas fúngicas secretadas como ligninasas, o lignina peroxidasas y peroxidasas dependientes de manganeso.
- Clase III: Consiste en peroxidasas secretorias de plantas, las cuales tienen múltiples funciones tejido-específico.

Las peroxidasas Clase III de plantas, pueden catalizar diferentes reacciones. Como se ilustra en la Figura 4, son capaces de llevar a cabo la lignificaci6n de la pared celular en las plantas, durante su ciclo peroxidativo. En éste, las peroxidasas forman H_2O a partir de H_2O_2 , formando el compuesto I (estadio intermedio de la enzima, se caracteriza porque puede aceptar dos electrones), el cual puede realizar otra reacci6n en presencia de un compuesto fen6lico, oxidándolo y produciendo un radical fenoxi, junto con el compuesto II (estadio intermedio de la enzima caracterizado porque puede recibir un electr6n) y este último puede recibir un electr6n de otro compuesto fen6lico,

produciendo nuevamente un radical fenoxi. En este par de reacciones se forman 2 radicales fenoxi, los cuales pueden combinarse para formar compuestos como la lignina, con la utilización de H₂O₂. Por otra parte, tanto el compuesto I como el compuesto II pueden oxidar NADH o NADPH, los cuales pueden a su vez reducir al O₂ para formar O₂⁻, el cual puede reducirse nuevamente en presencia de NADH o NADPH para generar H₂O₂. También se ha reportado que se podría llevar a cabo un ciclo hidroxílico, en el cual, en presencia de O₂⁻ se formaría el compuesto III, un estado intermedio de la enzima que en presencia de H₂O₂ produciría radicales hidroxilo en una reacción tipo Fenton (Chen y Schopfer, 1999):



Esta última función ha sido demostrada en coleoptilos de maíz, donde se pudo observar que en presencia de NADPH o NADH una peroxidasa de pared celular es capaz de generar radicales hidroxilo y la generación de estos radicales, de acuerdo a los autores, promueve el debilitamiento de la pared celular, mediando el crecimiento celular (Liszakay *et al.*, 2003).

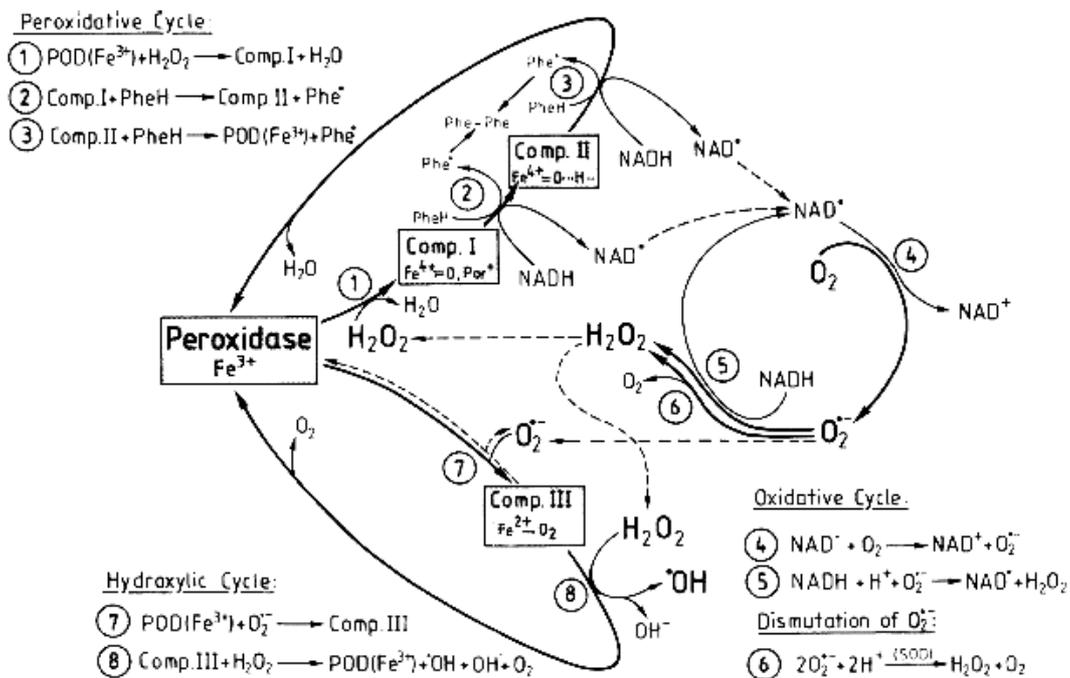


Figura 4. Esquema ilustrativo sobre las diferentes funciones catalíticas de las peroxidasa clase III de plantas. POD, peroxidasa; PheH compuesto fenólico; Comp.I, Comp.II y Comp.III, estadios intermedio de la peroxidasa ; SOD, superóxido dismutasa (Tomado de Liszkay *et al.*, 2003).

Otras funciones atribuidas a estas enzimas, son su participación en la respuesta de defensa ante el ataque de un patógeno. Delannoy *et al* (2003), reportaron que existe un aumento en la actividad de las peroxidasas durante la infección en cotiledones de algodón infectados con *Xanthomonas campestris*. Mediante el uso de anticuerpos policlonales encontraron que estas proteínas se encuentran alrededor de la bacteria encapsulada, así como en la lamela media. También pudieron observar que de los siete genes de peroxidasas que estudiaron, tres de éstos incrementaban su expresión en respuesta al patógeno, uno disminuía y los tres restantes no mostraban cambio en su patrón de expresión. El incremento en la actividad de estas enzimas fue reportado también en plantas de chícharo, al ser tratadas con un patógeno de origen fúngico; este aumento se observó mediante ensayos inmunocitoquímicos en la pared celular de las raíces infectadas por el patógeno, (Luhova *et al.*, 2006). En plantas de frijol se ha visto que la responsable de la explosión oxidativa apoplástica en células en cultivo es una peroxidasa (FBP1), esto en presencia de un elicitor fúngico (Blee *et al.*, 2001). Además, las plantas transgénicas de *A. thaliana* que tienen un cADN en antisentido, del gen de la peroxidasa FBP1 de frijol, mostraron una disminución en la explosión oxidativa cuando fueron tratadas con elicitores de tipo fúngico, así como una mayor susceptibilidad al ataque de patógenos oportunistas, lo cual demuestra que las peroxidasas juegan un papel significativo durante la explosión oxidativa ante el ataque de patógenos (Bindschedler *et al.*, 2006) También se ha propuesto que las peroxidasas catalizan la generación de EOR durante el cierre de los estomas, en presencia de ácido salicílico, ya que esta respuesta no es afectada por el tratamiento con DPI (*diphenylene iodonium*), el cual es un inhibidor de las NADPH oxidasas, sin embargo es altamente sensible al ácido salicílico hidroxámico (SHAM), el cual es un inhibidor de las peroxidasas. La producción de EOR en presencia de elicitores (quitoligosacáridos) y de monoaminas aromáticas es también sensible al tratamiento con SHAM (revisado en Kawano, 2003). Por otra parte, la sobre-expresión de una peroxidasa de cebada en plantas de tabaco provoca un aumento en el índice de muerte celular programada al ser expuestas a un estrés de calor, suponiendo un aumento en la generación de EOR (Burbridge *et al.*, 2006).

EOR Y SU REGULACION DURANTE LA SIMBIOSIS RHIZOBIA-LEGUMINOSA

En el caso del proceso simbiótico, se ha propuesto que en los nódulos los niveles de EOR deberían estar finamente regulados. Así, se ha encontrado que cuando los niveles de EOR se incrementan por factores como el estrés salino, los nódulos presentan una reducción de hasta un 56% en su peso seco. También se ha observado que hay una reducción en la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la catalasa y la ascorbato peroxidasa, y un aumento en la actividad de enzimas como las peroxidases y la superóxido dismutasa (Jebara *et al.*, 2005). Durante la senescencia del nódulo se ha descrito que hay una disminución en el contenido de una peroxiredoxina y ascorbato, así como un aumento en la actividad de serin-proteinasas y cistein-proteinasas sensibles al estado redox (Groten *et al.*, 2006).

En raíces noduladas se ha visto que la actividad de las principales enzimas antioxidantes es mayor que en raíces sin infectar. Los niveles de ascorbato, así como el transcrito de la ascorbato peroxidasa aumentan en un orden de 10 veces en nódulos con respecto a otros tejidos. En el caso de nódulos determinados su actividad se ha encontrado principalmente en la periferia de las células del parénquima, donde protege a éstas del H₂O₂ (Dalton *et al.*, 1998; revisado en Matamoros *et al.*, 2003).

En estudios enfocados en la regulación de las EOR durante la organogénesis del nódulo, se ha visto que la formación de nódulos en raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti*, se ve afectada al aplicar BSO (sulfoximina de butionina), que es un inhibidor específico de la síntesis de GSH (revisado en Pauly *et al.*, 2006).

Lee *et al* (2005), al analizar los genes expresados durante la nodulación en plantas de soya (*G. max*), encontraron que hay un incremento en el transcrito de una tioredoxina, 2 días después de la inoculación con la bacteria, con un incremento mayor a los 7 y 27 días posteriores a la inoculación. Además, demostraron mediante el silenciamiento del gen, que su ausencia provoca una reducción en el número y tamaño de los nódulos.

Mediante ensayos con microarreglos en raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti*, se ha observado un descenso en la transcripción de peroxidases, 1 hr después de la inoculación, sin embargo hay un aumento 6 hrs después con respecto a los niveles basales de la transcripción de peroxidases (Lohar *et al.*, 2006).

Shaw y Long (2003) trataron segmentos de raíces de *M. truncatula* con factores Nod purificados de *S. meliloti* durante una hora y midieron los cambios de eflujo de H₂O₂ a intervalos de 5 min durante 90 min. Estos autores encontraron que a concentraciones mayores a 100 pM, los factores Nod reducían el eflujo de H₂O₂ en un 60% después de 20 a 30 min de exposición. Recientemente, se demostró que hay una disminución en el transcrito de 2 NADPH oxidasas: MtRBOH2 y MtRBOH3 en raíces de *M. truncatula*, 1 hr después de aplicar factores Nod. Además reportan que es necesario un descenso en la concentración de EOR para el hinchamiento y la ramificación de los pelos radicales en respuesta al tratamiento con los factores Nod (Lohar *et al.*, 2007).

En la simbiosis de *M. truncatula* con *S. meliloti*, se encontró mediante hibridación sustractiva, un gen que codifica para una peroxidasa, denominado *rip1*, por sus siglas en inglés rhizobium-induced-peroxidase. En raíces de *M. truncatula* se encontró que hay un incremento en la acumulación del transcrito de *rip1*, 3 hrs después de ser inoculadas con *S. meliloti*, mientras que en respuesta al tratamiento con factores Nod específicos, el incremento se observó 6 hrs después (Cook *et al.*, 1995). El análisis de la secuencia de este gen, reveló que río arriba de la región promotora hay 3 copias de un elemento consenso OCS (*octopine synthase*) y 8 de un elemento OBP (*OBF binding protein*), cercanos al sitio de inicio de transcripción del gen. Estos elementos, son comunes en regiones promotoras de genes de plantas inducidos por la presencia de EOR, en particular por H₂O₂ (Peng *et al.*, 1996). También encontraron que existe una explosión oxidativa 12 hrs después del tratamiento con los factores Nod así como durante la formación del primordio del nódulo y que hay una correlación espacio-temporal en la expresión de *rip1* y la producción de EOR (Ramu *et al.*, 2002).

Recientemente Den Herder *et al* (2007) observaron un incremento en la acumulación del transcrito de una peroxidasa (*Srprx*) en la simbiosis entre *Sesbania rostrata* y *Azorhizobium caulinodans*, una hora después del tratamiento con los factores de nodulación de su microsimbionte. Además, reportan que no hay incremento en la acumulación de este transcrito en respuesta a elicitores de patógenos y tampoco a estrés mecánico.

En nuestro grupo de trabajo, Cárdenas *et al* (manuscrito sometido a publicación, 2007) encontraron un incremento transitorio en la concentración de EOR en pelos radicales de frijol tratados con factores Nod de *R. etli*. Este aumento en la concentración

de EOR se observa segundos después de aplicar los factores Nod y se mantiene durante 3 min para después retomar sus niveles basales.

Uno de los intereses de nuestro grupo de investigación es estudiar las etapas iniciales de la interacción entre *P. vulgaris* y *R. etli*, y específicamente el papel de las EOR durante este proceso. Es por ello, que nos dimos a la tarea de estudiar el patrón de acumulación del transcrito de una peroxidasa a la que llamamos *Pvrip1*, en respuesta al tratamiento con factores Nod.

AISLAMIENTO DEL cADN *Pvrip1*

En el laboratorio se realizó el diseño y síntesis de oligonucleótidos específicos para aislar y amplificar mediante PCR, a partir de ADN genómico, una región del gen de la peroxidasa *Mtrip1*. Los oligonucleótidos utilizados fueron: 5' CCA CAA TTT TTC TAC AAT GTG; 3' CTA TCT GAC CCT TCT GCA A. Estos oligonucleótidos al ser usados mediante PCR, amplifican aproximadamente el 70% de la región codificante. Una vez amplificado parte del gen, el producto de PCR se marcó radioactivamente y se utilizó como sonda para aislar a su ortólogo en un banco de cADNs de raíces de frijol crecidas en bajo fosfato, ya que éste era el banco disponible. Se seleccionó una de las clonas y se determinó su secuencia nucleotídica. El cADN aislado resultó ser una clona parcial de 800 pares de bases, la cual carece de la región 3' y 5' no traducida y traducida, e incluye el probable péptido señal descrito en la peroxidasa reportada en *M. truncatula*.

La secuencia nucleotídica del cADN se alineó mediante un BLAST utilizando el NCBI/BLAST, presentando el mayor porcentaje de identidad con *Mtrip1* (80%), que es la que se usó como sonda para aislar el cADN de frijol. En base a este resultado, al cADN aislado por nuestro laboratorio se le denominó *Pvrip1*.

El aislamiento y la identificación de este cADN parcial, se llevo a cabo en el laboratorio por la Biol. O. Santana, previo a la disponibilidad de los EST's de frijol reportados por Ramírez *et al* (2005).

HIPOTESIS

OBJETIVOS

- **General**
- **Específicos**

III. HIPOTESIS

La aplicación de factores Nod específicos en las raíces de *P. vulgaris*, incrementará la transcripción del gen *Pvrip1* a tiempos cortos, en raíces de *P. vulgaris*

IV. OBJETIVOS

GENERAL:

Analizar el patrón de acumulación del transcrito *Pvrip1* a tiempos cortos en raíces de *P. vulgaris*, después de aplicar los factores Nod de *R. etli* y determinar su localización en la raíz.

ESPECIFICOS

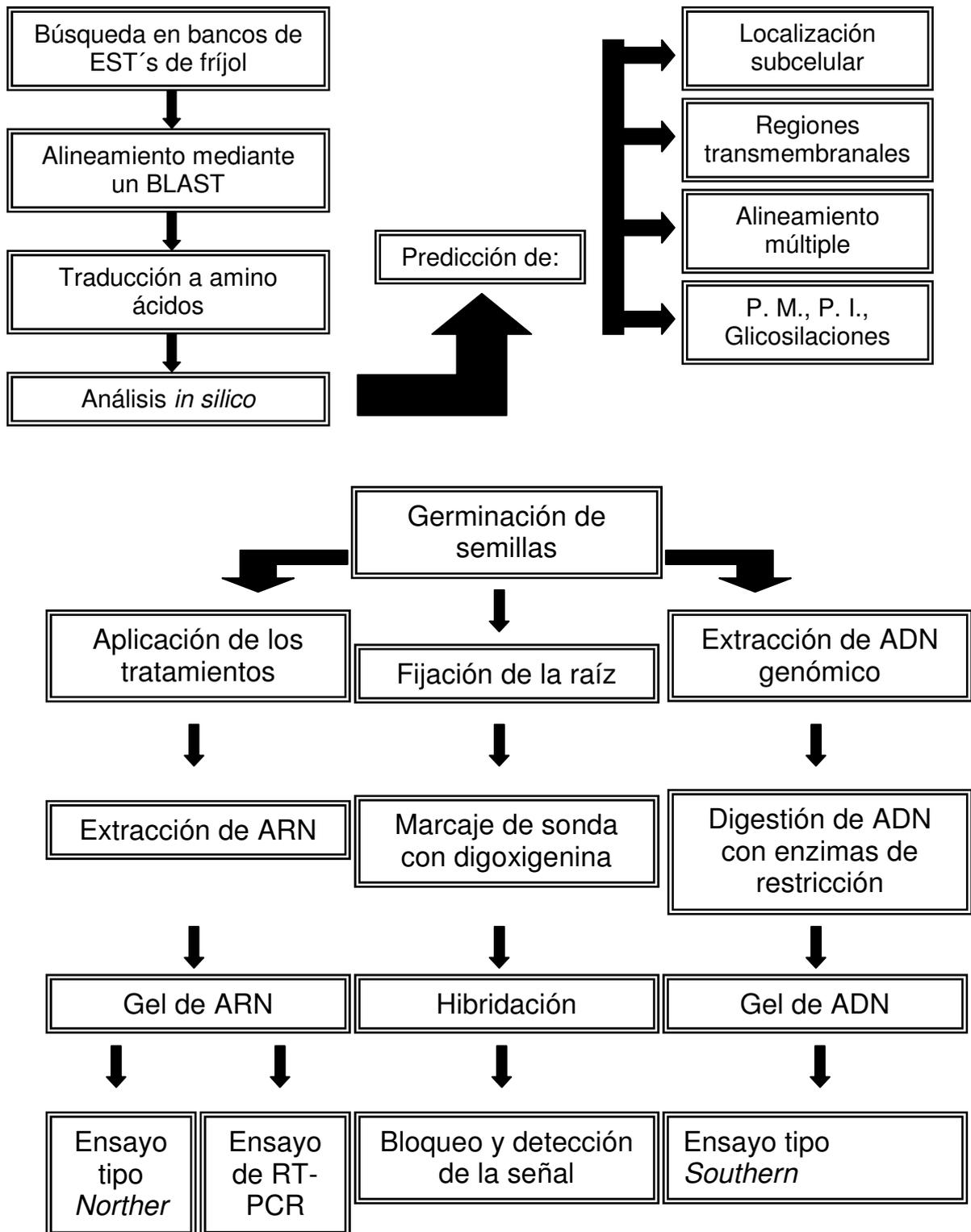
- Análisis *in silico* del cADN aislado de un banco de cADNs de raíces de frijol
- Determinar el número de copias del transcrito *Pvrip1* en el genoma de frijol.
- Localización del transcrito *Pvrip1* en las raíces de frijol, mediante hibridación *in situ*.
- Determinar el patrón de expresión del transcrito que codifica el gen *Pvrip1* de frijol, en respuesta a los factores Nod de *R. etli* (0, 1, 3 y 6 hrs).
- Analizar la acumulación del transcrito en respuesta a estreses bióticos (elicitors de patógenos) y abióticos (daño por herida).

MATERIAL Y METODOS

- **Ensayo tipo *Southern***
- **Germinación de semillas de fríjol
(*Phaseolus vulgaris* variedad Negro
Jamada**
- **Aplicación de los diferentes
tratamientos a las raíces**
- **Ensayo tipo *Northern***
- **Ensayos de RT-PCR**
- **Hibridación *in situ***

IV. METODOLOGIA

Los objetivos previamente descritos, se realizaron mediante el siguiente diseño experimental:



Ensayo tipo Southern

Extracción del ADN genómico

- Se tomaron 3 hojas completamente desarrolladas del tercer nudo de plantas de frijol de 18 a 20 días.
- Se maceraron las hojas en nitrógeno líquido con un mortero y el polvo se transfirió a un tubo con el buffer de aislamiento de ADN precalentado a 65° C y se mezcló suavemente (2 ml de buffer por gramo de tejido).
- Posteriormente se añadió un volumen de CHCl₃/Isoamil-OH (24:1) y se mezcló suavemente a 65° C, ventilando y moviendo periódicamente de forma delicada.
- Se incubó esta mezcla a 65° C por 10 min con una agitación moderada.
- Se centrifugó durante 5 min a 5,000 rpm para separar las fases.
- Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se añadió un volumen de isopropanol frío.
- Después se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 min y se retiró el sobrenadante, resuspendiendo el pellet con 1.3 ml de CsCl 1M (400µl/300mg de tejido utilizado).
- Se dividió la muestra en 4 tubos (330µl/tubo) y se añadieron 800µl de etanol, mezclando suavemente el tubo.
- Se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 min y se retiró el sobrenadante, disolviendo el pellet en 250µl de TE-ARNsa (250µl de TE/ 1µl ARNsa 10 mg/ml).
- Se agregaron 60µl de NaCl 5M y la mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1)
- Se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm y se tomo la fase superior y se transfirió a un nuevo tubo eppendor. Después se agregaron 500µl de CHCl₃ y se agitó.
- Se añadió etanol (1ml por muestra), lo cual permitió observar las hebras de ADN.
- Se centrifugó a 13,000 rpm y a la pastilla se lavó con etanol. Este procedimiento se repitió dos veces.
- Finalmente la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril

Determinación de la concentración del ADN

La determinación de la concentración del ADN extraído, se realizó mediante el método espectrofotométrico (Sambrook *et al.*, 1989). Se diluyó 1 µl del ADN extraído en 0.5 ml de H₂O. Se tomaron lecturas de absorbancia a 260 nm y 280nm. La concentración fue calculada respecto a los valores estándar de densidad óptica: D.O.=1 a 260nm corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de ADN.

Digestión de ADN genómico con enzimas de restricción

Una vez cuantificada la concentración del ADN genómico extraído de las hojas de frijol, se realizó el cálculo para digerir 20µg de ADN genómico por enzima de restricción. Se utilizaron las enzimas *EcoRI* (30 unidades de la enzima) *HindIII* (30 unidades de la enzima), *BamHI* (40 unidades de la enzima) y *EcoRV* (60 unidades de la enzima).

Electroforésis de ADN y carga de las muestras

La digestión del ADN genómico se verificó mediante un gel de agarosa al 1% disuelta con calor en TAE y Bromuro de Etidio 0.01%, éste último se adicionó una vez disuelta la agarosa a una temperatura de 40° C aproximadamente. La electroforesis se realizó en posición horizontal cargando en el gel 5 µl del ADN total digerido, usando 1µl del buffer de carga. Una vez determinada la digestión del ADN se procedió a realizar la carga total de las muestras. En cada pozo de un gel para ADN se agregó el volumen equivalente a 20µg de muestra, utilizando buffer de carga al 10% del volumen total. En el gel también se hizo la carga de un marcador de peso molecular para ADN.

Ensayo tipo *Southern*

La sonda utilizada se marcó con ³²P y consistió en un producto de PCR que amplificó la secuencia de la clona aislada del banco de cADNs de raíces de fríjol. Esta clona carece de la secuencia perteneciente al péptido señal, así como también parte de la región 3' traducida. La secuencia es de aproximadamente 800 pares de bases, la cual incluye región conservada y no conservada descrita para las peroxidasas Clase III de plantas.

Germinación de las semillas de fríjol

Las semillas se desinfectaron realizando el siguiente protocolo:

- Lavado durante 5 min con hipoclorito de sodio 25% V/V.
- Lavado 3 veces con agua estéril, para eliminar restos de hipoclorito.
- Lavado durante 1 min con alcohol etílico industrial.
- Lavado 3 veces con agua estéril para eliminar los restos de alcohol.

Las semillas fueron colocadas en charolas metálicas previamente esterilizadas (20 min a 120° C y 150 kPa.), cubiertas con papel aluminio y con una capa de papel absorbente humedecido con medio Fåhreaus* estéril a un pH = 7. Se incubaron a 28° C por 48 hrs.

*Preparación del Medio Fåhreaus	
Compuesto	Concentración final
CaCl ₂	0.680 mM
MgSO ₄	0.486 mM
KH ₂ PO ₄	0.734 mM
Na ₂ HPO ₄	1.042 mM
Citrato férrico	18.5 µM
+MnZO ₄	12 µM
+ZnSO ₄	765.1 µM
+H ₃ BO ₃	46.25 µM
+CuSO ₄	320 µM
+H ₂ MoO ₄	38.8 µM
+ En su conjunto se conocen como trazas Gibson	

Una vez germinadas las semillas se transfirieron a cajas, de tal manera que la raíz quedara sumergida en el medio Fåhreaus que se utilizó para la germinación, es decir, se transfirieron de un medio sólido (charola) a un medio líquido, dejando reposar durante 24 hrs para poder llevar a cabo los diferentes tratamientos, evitando de esta manera un estrés a las plántulas.

Aplicación de los diferentes tratamientos a las raíces de fríjol

Tratamiento con los factores de nodulación

Se utilizaron factores Nod específicos, aplicados a una concentración de 1×10^{-8} M en la cámara con el medio de crecimiento conteniendo las raíces de semillas germinadas de fríjol.

Inoculación con *Rhizobium etli*

La cepa CE-3 de *R. etli* se cultivó en un medio con peptona de caseína (5g/L) y extracto de levadura (3g/L) adicionado con CaCl₂ 0.07M. Los antibióticos ácido nalidíxico (2mg/100ml) y estreptomycin (100mg/100ml) se utilizaron para crecer y seleccionar la cepa CE-3. Los cultivos se incubaron a 30° C con agitación hasta una D. O. de 0.5-0.6 leído a una longitud de onda de 600 nm. Las células de este cultivo, se lavaron 2 veces y se resuspendieron en 50 ml de medio Fåhreaus.

Aplicación de estrés por herida

Una vez que se dejaron reposar las plántulas de frijol durante un día en la cámara con el medio Fåhreus, se les aplicó un estrés por herida, el cual consistió en cortar una de las raíces laterales, posteriormente se sumergieron nuevamente en el medio, para posteriormente realizar la cosecha del tejido a los tiempos predeterminados.

Tratamiento con elicitador de origen fúngico

La preparación del elicitador se realizó de acuerdo a Ludger y Ursel (1995):

- Se tomaron 10 g de extracto de levadura (GIBCO BRL) en 50 ml de etanol (80%).
- Se centrifugó y el sobrenadante se evaporó y el residuo se disolvió en 12.5 ml de agua.
- Después se realizó una extracción con 25 ml de acetato de etilo y se centrifugó la fase acuosa, posteriormente se esterilizó mediante filtración.

Tratamiento con el elicitador quitosan

El tratamiento con quitosan se realizó basándonos en lo reportado por Vasconsuelo *et al.*, (2004). Se preparó una solución concentrada (8mg/ml) de quitosan (Sigma: restos de concha de cangrejo, homopolímeros lineales β -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa 85% deacetilado), el cual fue disuelto en ácido acético al 1% (toda la noche), posteriormente esterilizado en autoclave y ajustado el pH a 5.6. El elicitador fue aplicado a una concentración de 100mg/ml. Se realizaron las pruebas pertinentes para comprobar que no cambiara el pH del medio de crecimiento de las raíces de frijol.

Ensayos tipo Northern

Extracción de ARN

Las raíces se cortaron tomando la parte de la zona de emergencia y crecimiento de las raíces secundarias, a los tiempos preestablecidos. Se tomaron de cada tiempo al menos 3 plantas; a partir de este material se extrajo el ARN total de cada muestra,

siguiendo el método del Trizol, de acuerdo al protocolo que se adjunta a continuación. Este material se utilizó para los experimentos tipo *Northern*.

Extracción de ARN
<p>Lavar el material a usar durante 1h con NaOH 1M. Esterilizar y hornear usando para todo H₂O tratada con DEPC 0.1%.</p> <ul style="list-style-type: none">• Agregar 100 mg de tejido congelado a un mortero con pistilo.• Adicionar suficiente nitrógeno líquido para cubrir el tejido. Macerar el tejido hasta formar un fino polvo.• Añadir 1 ml de Trizol. Continuar macerando el tejido.• Transferir 1 ml de las muestras a tubos eppendorf y dejar reposar durante 5 min a temperatura ambiente.• Adicionar 0.2 ml de cloroformo/alcohol-isoamilico (24:1) y colocar en el vórtex de 5-15 segundos. Dejar reposar durante 2 min.• Centrifugar las muestras durante 5 min a la máxima velocidad. Remover el sobrenadante a un nuevo tubo.• Agregar 0.5 ml de alcohol isopropílico. Vortexear durante 5 segundos. Dejar reposar durante 10 min.• Desechar el sobrenadante. Dar un pulso en la centrífuga. Remover el sobrenadante restante. Añadir 0.5 ml de etanol al 70%.• Centrifugar a la velocidad máxima durante 2 min.• Desechar el sobrenadante. Dar un pulso en la centrífuga. Remover el sobrenadante restante. Adicionar 15-50 µl de agua DEPC:

Determinación de la concentración del ARN

La determinación de la concentración de cada una de las muestras del ARN extraído, se realizó mediante el método espectrofotométrico (Sambrook *et al.*, 1989). Se diluyó 1 µl del ARN extraído en 0.5 ml de H₂O en cada muestra. Se tomaron lecturas de absorbancia a 260 nm y 280nm. La concentración fue calculada respecto a los valores estándar de densidad óptica: D.O.=1 a 260nm corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de ARN. El cociente entre las lecturas a 260nm y 280nm permite estimar la pureza de cada muestra, de esta forma, valores por debajo del cociente a 260nm/280nm=2.0 nos indicará que la pureza del ARN es pobre.

Electroforesis de ARN y Carga de las Muestras

La integridad del ARN extraído de cada una de las muestras fue determinada mediante la elaboración de geles de agarosa al 1% disuelta con calor en MOPS 1X (MOPS 20 mM, acetato de sodio 0.3M, EDTA 0.05M) y formaldeído 1.1%, éste último se adicionó una vez disuelta la agarosa y estando a una temperatura de 55° C

aproximadamente. La electroforesis se realizó en posición horizontal cargando en el gel 1 µg de ARN total, usando como buffer de carga la siguiente mezcla:

- Glicerol 500 µl
- Azul de bromofenol 250 µl
- H₂O 500 µl

Una vez determinada la concentración e integridad del ARN se procedió a realizar la carga total de muestra. En cada pozo de un gel para ARN se agregó el volumen equivalente a 20µg de muestra, con el doble de volumen de buffer de carga. En el gel también se hizo la carga de un marcador de peso molecular para ARN.

Preparación de la sonda para los ensayos tipo *Northern*

La sonda utilizada consistió en un producto de PCR que amplificó la secuencia de la clona aislada del banco de cADNs de raíces de frijol. Esta clona carece de la secuencia perteneciente al péptido señal, así como también parte de la región 3' traducida. Cabe mencionar que la secuencia presenta tanto región conservada entre las peroxidases como región no conservada.

Hibridación con la sonda Marcada

La sonda se marcó con ³²P dCTP de acuerdo al protocolo del Kit de marcaje Rediprime II Random (RPN1633) (Amersham). Para precipitar la sonda, se le agregó al tubo de reacción 300 µl de RPE (ADN de esperma de salmón 0.1mg/ml, EDTA 10mM, acetato de amonio 2.5M) y 600 µl de isopropanol, y se dejó reposando durante 24 hrs a -20 °C. Después de este tiempo, el tubo se centrifugó a 13000 rpm por 15 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200µl de NaOH 0.1N; posteriormente se agregó al tubo de hibridación, el cual contiene: BSA 1%, EDTA 0.5 M, NaH₂PO₄ pH 7.2 2 M y SDS 20%. Simultáneamente las membranas se prehibridaron al menos 24 hrs antes de la hibridación. La hibridación se realizó a 60° C por 48 hrs.

Las membranas hibridadas se lavaron en solución de baja astringencia durante 15 min a temperatura ambiente, conteniendo: EDTA 0.5M, NaH₂PO₄ pH 7.2 2 M, SDS 20% y BSA 0.5%, después durante otros 15 min a 60° C en solución de alta astringencia

que consiste en: EDTA 0.5M, NaH₂PO₄ pH 7.2 2 M y SDS 20%. Finalmente las membranas se colocaron en protectores de plástico para exponerlas en una pantalla de Fosfo-Imager.

Ensayos de RT-PCR

Para los ensayos de RT-PCR, se partió de los ARN extraídos bajo la metodología previamente descrita. Para amplificar el transcrito *Pvrip1*, se diseñaron oligonucleótidos específicos de la región 5' UTR y 3' UTR, dando un producto de aproximadamente 1 Kb (Pvrip1UP: TCC AGA GCT TGT AAT CTG TG; Pvrip1LW: GCA AAG TTA TGA GTC ATA GC). Como control positivo del tratamiento con factores Nod, se amplificó parte del gen (380 pb) de la nodulina *Enod40* (PvENOD40-1: CTG GTG AGC ATC AAG TTT TG; PvENOD40-2: CTA GTG AGC TGC AAA TTG AG), como control positivo del tratamiento con el elicitor quitosan se amplificó un fragmento del transcrito de la *Chalcona sintasa* (PvCHS-1: ATG GTG AGT GTA TCT GAG ATC C; PvCHS-2: TTG CGA CAC TGT GGA GAA CGA) y como gen control, parte del gen de acuaporina (AQU: CGC CGC TGT TTG AGC CCT CG; AQL: TTG CGC ATC GTT TGG CAT CG).

RT-PCR

1. En tubos para microfuga estériles, se colocaron 2 µl de ARN (1 µg/µl), 8 µl de H₂O y 1 µl de DNAsaI libre de RNAsa 10u/µl Roche^{MR}, se incubó a 37° C por 15 minutos y después a 65° C por 10 minutos.
2. Se agregó 1 µl de oligonucleótido (dT) 500 µg/ml y se incubó a 70° C por 10 minutos, inmediatamente después se colocó en hielo.
3. Se hizo una mezcla: 1 µl dNTP's 10 mM cada uno, 2 µl de DTT 0.1 M y 4 µl de buffer de reacción 5 X. Se agregaron 7 µl de esta mezcla y se incubaron a 42° C por 2 minutos, después se agregó 1 µl de enzima M-MLV RT Invitrogen^{MR} 200u*/ µl y se dejó incubando durante 50 minutos a 37° C.
4. Se incubó 15 minutos más a 70° C para inactivar la enzima y detener la reacción.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)		
Compuesto	Volúmen	Concentración final
Buffer de reacción 10 X	5 µl	1 X
Mezcla de *dNTP's 10 mM	1 µl	0.2mM
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µl	3 mM
Oligonucleótido lower 5 pmol/µl	1 µl	5 pmol/µl
Oligonucleótido upper 5 pmol/µl	1 µl	5 pmol/µl
cDNA 1µg/µl	2 µl	0.04 µg/µl
Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen ^{MR})	0.2 µl	1.0 unidad**
Agua destilada estéril	Aforar a 50 µl	

*Dideoxynucleótidos trifosfatados

** Una unidad incorpora 10 nmol de desoxirribonucleótidos en 30 minutos a 72° C

Hibridación *in situ* (whole mount)

Marcaje de la sonda de *Pvrip1*

Esta sonda se encuentra clonada en el vector PSK. El fragmento de *Pvrip1* es de aproximadamente 900 pb. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la sonda mediante PCR son los oligos M13F y M13R, ya que es necesario que contenga los promotores T3 y T7. La sonda fue marcada con el protocolo que se adjunta:

Preparación de la sonda de ARN con dig-UTP

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• A 10 µl de una reacción de PCR que contenga la sonda con los promotores T3 y T7 añadir 2 µl de DIG ARN labeling mix 10X (Roche). La cual contiene: 10mM de cada nucleótido ATP, CTP, y GTP; 6.5 mM UTP y 3.5 mM DIG-UTP.• Adicionar 4 µl de buffer de transcripción 5X.• Agregar 2 µl de DTT 0.1 M y mezclar en el vortex.• Adicionar 2µl de ARN polimerasa T3 y ARN polimerasa T7.• Mezclar los componentes y centrifugar el tubo por 10 segundos.• Incubar la reacción 2 hrs a 37° C.• Adicionar 1 µl de ADNsa libre de ARNsa e incubar a 37°C por 15 min.• Parar la reacción con 2 µl de 0.2M EDTA pH8.• Precipitar el transcrito de ARN marcado adicionando: 2.5 µl de LiCl. 4 M y 75 µl de etanol 100% frío (-20° C) y mezclar muy bien. Dejar precipitando durante 30 min a -70° C.• Centrifugar 15 min a 4° C y decantar el sobrenadante.• Lavar el pellet con 50 µl de etanol al 70% frío y centrifugar el tubo 5 min a 4° C, decantar el sobrenadante.• Dejar secar el pellet por 5 min al aire y disolver el pellet en 100 µl de agua para ARN (DEPC).• Correr en un gel de agarosa 1 µl de la muestra para verificar su integridad.• Hidrolizar el transcrito adicionando dos volúmenes de buffer de carbonato (60mM Na₂CO₃, 40 mM NaHCO₃ pH 10.2) e incubar durante 40 min a 60° C.• Adicionar un volumen de buffer de neutralización (NaOAc 3 M, 1% (v/v) ácido acético pH 6) para parar la hidrólisis.• Adicionar 3 volúmenes de etanol frío (-70° C) para precipitar el ARN, mezclar bien e incubar a -70° C por 30 min.• Centrifugar 15 min a 4° C y decantar el sobrenadante.• Lavar el pellet con 100µl de Etanol al 70% frío y centrifugar el tubo 5 min a 4° C, decantar el sobrenadante.• Dejar secar el pellet por 5 min al aire libre y disolver el pellet en 100 µl de agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato).• Correr una alícuota del transcrito (1 µl) en un gel de agarosa. El transcrito puede verse como una mancha de alrededor de 200 pb o menos. |
|---|

Fijación de la muestra

Los tejidos a estudiar se fijaron y posteriormente se hibridaron con la sonda marcada. Para ello se eligieron raíces de fríjol de 3 días. La fijación de los tejidos se realizó de acuerdo al protocolo que se adjunta:

Fijación de la muestra
<ul style="list-style-type: none">• Fijar muestras de plantas en BF (PBS 1X, 0.1% Tween, 0.08 M EGTA, 15% DMSO, 5% Formaldehído):Heptano (1:1) por 30 min• Lavar las muestras con metanol 2 veces por 5 min.• Lavar las muestras con etanol absoluto 3 veces por 5 min. En este paso la muestra puede dejarse en etanol al 70% por varios días a -20° C hasta que se realice la hibridación.

Hibridación

Una vez marcada la sonda y fijados los tejidos, se procedió a la hibridación y después de ello el tratamiento de post hibridación, para posteriormente realizar el bloqueo y detección de la señal. Para dicho propósito se realizó la siguiente metodología:

Tratamiento de pre-hibridación e hibridación
<ul style="list-style-type: none">• Si se detuvo en el paso anterior, lavar 2 veces con etanol durante 5 min.• Lavar las muestras con etanol: xileno (1:1) durante 30 min.• Lavar las muestras con etanol 2 veces durante 5 min.• Rehidratar con series de Etanol/PBS 1X al 75%, 50% y 25% por 10 min cada uno.• Post-fijar en el BF durante 20 min.• Lavar con PBS 1X 2 veces por 10 min.• Tratar con proteinasa K (20µg/ml en PBS 1X) por 15min a 37° C (sin agitación).• Parar la reacción con glicina (2µg/ml en PBS 1X) durante 5 min.• Lavar en PBT 2 veces por 10 min.• Pasar las muestras a tubos eppendorf y prehibridar en el BH (50% formamida, 5X SSC, 0.1 mg/ml heparina, 0.1% Tween 20, 0.1-1mg/ml ADN esperma de salmón (desnaturalizado a 85° C durante 5 min) durante una hora a 45° C en un termomixer con agitación moderada.• Hibridar en el BH con 20-100 ng/ml de la sonda (desnaturalizada por 5 min a 85° C) durante 16 hrs a 45° C.

Lavado post-hibridación
<ul style="list-style-type: none">• Lavar a 50° C con Buffer de lavado I (50% Formamida, SSC 2X, Tween 20 0.1%) por 10, 60 y 20 min.• Lavar a 50° C con Buffer de lavado II (SSC 2X, Tween 20 0.1%) por 20 min.• Lavar a 50° C con Buffer de lavado III (SSC 0.2X, Tween 20 0.1%) por 20 min.• Lavar a temperatura ambiente con PBT (PBS 1X, Tween 20 .1%) 3 veces por 10 min.

Bloqueo y detección de la señal
<ul style="list-style-type: none">• Bloquear en el BB (PBS 1X, Tween 20 0.1%, BSA 1%) por 90 min.• Incubar con el anticuerpo anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina (anticuerpo preabsorbido) en

una dilución 1:2000 (Tubo 8 Roche 1 µl en 2 ml) en el BB por 4 hrs a temperatura ambiente, o toda la noche a 4° C con agitación moderada.

- Lavar 8 veces en PBT por 20 min cada uno.
- Incubar en BFA (Tris-HCl pH 9.5 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl 50 mM, Tween 20 0.1%, Levamisol 2 mM).
- Detectar con reactivos para fosfatasa alcalina en BFA suplementado con 2 mM de levamisol y observar al microscopio.
- Parar la reacción en cuanto se observen diferencias con PBT 2 veces y 1 h en agua para montar en portaobjetos con glicerol al 50%.

El anticuerpo anti-digoxigenina, utilizado durante el ensayo debe ser preabsorbido, para evitar el background generado por las fosfatasas alcalinas endógenas de la planta.

Para ello se llevó a cabo la siguiente metodología:

Reabsorción del anticuerpo antidigoxigenina

- Macerar raíces bajo nitrógeno líquido.
- Agregar acetona al 90%. Dar un vórtex vigorosamente
- Almacenar toda la noche a 4° C.
- Centrifugar a 9000 xg durante 20 min.
- Dejar que se evaporen los residuos de acetona.
- Agregar 30 mg del tejido macerado en un tubo eppendorf con 400 µl de PBT + BSA 2%
- Adicionar 20 µl de anti-digoxigenin Fab-alkaline phosphatase a la mezcla.
- Incubar por 1-24 hrs en oscuridad.
- Centrifugar 5 min a 13000 xg. Retirar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo, ya que éste contiene el anticuerpo preabsorbido (almacenar a 4° C).

RESULTADOS

- **Análisis *in silico* del transcrito *Pvrip1***
- **Número de copias de *Pvrip1* en el genoma de fríjol**
- **Acumulación del transcrito *Pvrip1* en respuesta a diferentes tratamientos**
- **Localización del transcrito *Pvrip1* en las raíces de fríjol**

V. RESULTADOS

Análisis de la Secuencia del cADN denominado *Pvrip1*

El cADN de *Pvrip1*, aislado por nuestro grupo de trabajo, resultó ser una clona parcial de 800 pares de bases, que carecía de la región 5', la cual incluye el péptido señal descrito en la peroxidasa reportada en *M. truncatula* (Peng *et al.*, 1996). Mediante la búsqueda *in silico* en un banco de EST's de raíces de fríjol (previamente no disponibles), reportado por Ramírez *et al* (2005), se pudo obtener la secuencia correspondiente al probable péptido señal, el fragmento faltante hasta el codón de paro, así como la región 5' y 3' no traducida (Figura 5A). Los EST's que forman el *contig* TC369, corresponden a librerías de nódulo (1 y 3), librerías de raíces crecidas en bajo fósforo (2 y 6) y librerías de vaina (4 y 5) (Figura 5B). La secuencia de nucleótidos completa de fríjol, se alineó mediante un BLAST utilizando el NCBI/BLAST, dando como resultado identidad con peroxidases de distintas plantas. El mayor porcentaje de identidad obtenido (79%) fue con la peroxidasa de *M. truncatula rip1*, que es la que se usó como sonda para aislar el cDNA de fríjol (Figura 6).

A

GTTATGAAACACATAATAATTCTTTGAAGTAGATCTACAGAAAGAAGAAAAACGAAGTTTGTGTTTGTATTATAAAGATGTATCACTG
 AAAACTCATCATTATATAAAAAGTTGGAGGTGATGGCCGCTACTGTATTTGAATCACTGGTTTTGATGTTGAAGATAAGCTATGGCTT
 CTTCTCCTTTTCTATTTTGATGTTGCAGTGGTTATAGTAACTTATATATTTGGTCAAAGGTAGCAGACACAAAAAGGTGGTTATAT
 TATATATGTATAATATTGAAGAAAAATAGAATAATGTTGTGAAGAATAACATTTATTAAAGTAATGAAAAATGAGACAACATGGCTTG
 TGGTTAGCATGTTTCCTTCTTCTATATAAGTGGTTTGTGTTGGTAGCAAAGTTATGAGTCATAGCTTAAACATGGGTCTCATGATGA
 TGGTGTCCAATCATTGGCTGTGTTTGTGGTAATTGGCATGGTGATCACATTAATGATCCCTGCCAATGCAAAACCTCCTTCCCATTTC
 TATGATAAAGTTTGTCCCTGAGGCATTACCTGTCTAAGAACAAGTGGTTCAACGAGCAATTAACCGTGAACCACGCATTGGAGCTTCTC
 TTCTGCGTTTGCATTTCCATGACTGCTTCGTCAATGGGTGTGATGGATCAATTTTGTAGATGACACTAAAACTTCATTGGTGAGAA
 GACAGCTTTTGCAAATAATAATTCAGCAAGAGGGTTTCTGTGGTTGATGAAATCAAAGCAGCAGTGGACAGGCCTGCAAACGCCCA
 GTGGTGTGATGTGCAGATACTTAGCCATAGCAGCTCGTGATCCCGTAGCCATTTATGGGGTAAACACTTTTGGTACCAAGTGTAT
 TGGGCAGAAGAGATGCAAGGACTGCAAGCAGAAGTGTGCAAATTCATCTTCCACCACCACTTCAGTCTCTCAGCTTGTTC
 CAACTTCCAATCTCACGGATTGAATGTGAAGGACCTTGTGGCCCTCTCTGGAGGTCACACCATTGGCTTTGCAAGGTGTACTACCTTT
 AGAAGCAGAATCTACAATGAATCCAACATTGACCCAGGTTTGCAGCATCTTTGAGGAATACATGTCTCGAAGTGGTGGAGACAACA
 ACTTACAAAAATGGATCCTACTCCTGCAAGAGTTGACACCAAATACTTTACAGATTTGGTGCACAAAAAGGGTCTCCTCCATTCCGGA
 TCAAGAACTCTTCAAGGGACAAGGCAGAGAAAGTGACAAGCTGGTGCAGCTATACAGTAAAAACACTTTAGCTTTTGTAGAGATTTT
 AAAGCCTCAATGATTAAAAATGGGTAACCTTGAAGCCTCTTACTGGGAGGCAGGGAGAGATCAGATGTCATTGCAGAAGGATCAATTAGA
 ATCAGATTTACAAGCTCTGGATTATGCAATGGAAAGAATAAGAATCTTTATTTATGTCATCATATGCTTAGTCATGCAATTTTAGA
 CATGACTGTGATTGTTCAAGAAAAATGTTGCGTGTGATGTGTTGTTTAAAGCAACTTCAAATCATGAATAGTTGAACTCAAATGG
 TAAAAA

B

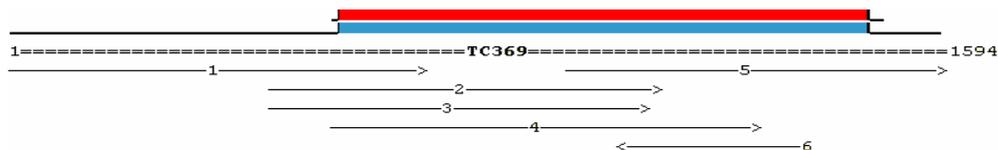


Figura 5. A, secuencia de nucleótidos de *Pvrip1*. ATG, codón de inicio; TAG, codón de término; Texto subrayado, secuencia obtenida de un banco de EST's de fríjol. B, En rojo, secuencia de la clona aislada por nuestro grupo de trabajo alineada con el *contig* TC369. Los números de acceso al *Genbank* de los EST's son: 1, CV537239; 2, CV542316; 3, CV537859; 4, CV540353; 5, CV540567 y 6, CV541590.

Esta secuencia nucleotídica también se alineó utilizando el programa Blastn, con secuencias que codifican diferentes peroxididasas reportadas en el banco de EST's de frijol por Ramírez *et al* (2005), así como también con 3 secuencias parciales que codifican peroxididasas encontradas en un banco de cADNs de raíces de frijol tratadas con factores de nodulación (1 a 72 hrs) que hemos construido en el laboratorio (datos sin publicar). Las secuencias alineadas no mostraron identidad (datos sin mostrar).

```

Score = 658 bits (342), Expect = 0.0
Identities = 726/918 (79%), Gaps = 0/918 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 84 TCACATCATTAAATCCCTAGCAACGCATTGCTCACTCCTCATTTTTATGATAATGTTGCC 143
Sbjct 485 TCACATTAATGATCCCTGCCAATGCAAACTCTCTCCCATTTCTATGATAAAGTTGTGTC 544

Query 144 CTC AAGCATTACCAACCATAAAGTCAGTTGTTCTCCATGCAATCTTAGGGAAAACGC A 203
Sbjct 545 CTGAGCATTACCTGTCTAAGAACAGTGGTTCAACGAGCAATTAACCGTGAACACGCA 604

Query 204 TTGGAGCATCTCTTCTACGCTTGCAATTTTCATGACTGCTTCGTTAATGGTTGTGATGGAT 263
Sbjct 605 TTGGAGCTTCTCTTCTGCGCTTTGCATTTCCATGACTGCTTCGTTCAATGGGTGTGATGGAT 664

Query 264 CAGTCCTGTAGATGATACCCAAAATTTCACTGGGGAGAAGACAGCTCTTCCAAATATTA 323
Sbjct 665 CAATTTGTAGATGACACTAAAACTTCATTGGTGAGAAGACAGCTTTTGC AAATAATA 724

Query 324 ATTC AATCAGAGGATTTTCTGTGGTTGATGAAATCAAAGCAGCTGTGATAAAGTATGCA 383
Sbjct 725 ATTCAGCAAGAGGGTTTTCTGTGGTTGATGAAATCAAAGCAGCAGTGGACAAGGCCGTGCA 784

Query 384 AAGGCCCTGTTGTATCTTGTGCTGATATTTTAGCCACAGCAGCTCGTATCTGTAGCCA 443
Sbjct 785 AAGCCCAAGTGGTGCATGTGCAGATATCTTAGCCATAGCAGCTCGTATCTCGTAGCCA 844

Query 444 TATTGGGAGGTCCACAATTTTCTACAATGTGTTATTGGGAAGAGAGATGCAAGAAGCAG 503
Sbjct 845 TTTATGGGGTAAACACTTTTGGTACCAAGTGTATTGGGCAGAAAGAGATGCAAGGACTG 904

Query 504 CAAGCAAAGCAGCTGCAAAATGCAAAATCTCCATCTCCAACATTCAACTTCTCGCAGCTTA 563
Sbjct 905 CAAGCAGAAGTGTGCAAAATTC AATCTCCCTCCACCAACCTTCAGTCTCTCAGCTTG 964

Query 564 TTTCCAAATTC A AATCACAAGGTTTAAATGTA AAAAGACCTAGTAGCTCTTCTGGTGGCC 623
Sbjct 965 TTTCCAACTTCC AATCTCACGGATTGAATGTGAAGACCTTGTGGCCCTCTCTGGAGGTC 1024

Query 624 ACACATATAGGGTTTGTAGGTGCACTACATTTAGAAAACAGAATTTAC AATGAAAACAACA 683
Sbjct 1025 ACACCATTTGCGCTTTGCAAGGTGACTACCTTTAGAAAGCAGAATCTAC AATGAATCCAACA 1084

Query 684 TTGATCCTATTTTTCAGCATCTTTAAGGAAGACATGTCCCTAGAAAATGGTGGAGACAACA 743
Sbjct 1085 TTGACCCCAAGTTCAGCATCTTTGAGGAATACATGTCCCTGAAAGTGGTGGAGACAACA 1144

Query 744 ATTTAACACCCTTGATTTCACCTCTACAAGAGTTGAAAATACATATTATAGAGATTTGC 803
Sbjct 1145 ACTTACAAA AATGGATCCTACTCTGCAAGAGTTGACACCAATACTTTACAGATTTGG 1204

Query 804 TATACAAAAGAGGTGCTCCTTCACTTCTGATCAACAATTGTTTAAAGGACAAGGTAGTGA A 863
Sbjct 1205 TGCACAAA AAGGGTCTCCTCCATTCGGATCAAGAACTCTTCAAGGGACAAGGCAGAGAAA 1264

Query 864 GTGACAAAATTGGTGCAGCTATATAGTAAGAACACTTTTGTCTTTTGTAGTATTTAAGA 923
Sbjct 1265 GTGACAAAGCTGGTGCAGCTATACAGTAAA AACACTTTAGCTTTTGTAGAGATTTCAAAG 1324

Query 924 CTTCTTTGATCAAGATGGGGAACATCAAGCCTTTTACCGGAGACAAGGCGAGATTCGAC 983
Sbjct 1325 CCTCAATGATTA A AATGGGTAAC TTGAAGCCTTTACTGGGAGGCGAGGAGATCAGAT 1384

Query 984 TCAATTGCAG AAGGTC A 1001
Sbjct 1385 GTCATTGCAG AAGGATCA 1402

```

Figura 6. Alineamiento a nivel de nucleótidos entre las secuencias codificantes de *Mtripl* y *Pvrip1*, mediante el programa Blastn. El programa alinea de forma local sobre la región mas parecida entre ambas secuencias.

La secuencia de nucleótidos de *Pvrip1* traducida a amino ácidos, dió como resultado un producto proteico de 333 residuos (Figura 7), cifra similar a la reportada en la peroxidasa de *M. truncatula* (325 residuos).

M G S H D D G V Q S L A V F V V I G M V I T L M I P A N A N
L S S H F Y D K V C P E A L P V I R T V V Q R A I N R E P R
I G A S L L R L H F H D C F V N G C D G S I L L D D T K N F
I G E K T A F A N N N S A R G F S V V D E I K A A V D K A C
K R P V V S C A D I L A I A A R D S V A I Y G G K H F W Y Q
V L L G R R D A R T A S R S A A N S N L P P P T F S F S Q L
V S N F Q S H G L N V K D L V A L S G G H T I G F A R C T T
F R S R I Y N E S N I D P R F A A S L R N T C P R S G G D N
N L Q K L D P T P A R V D T K Y F T D L V H K K G L L H S D
Q E L F K G Q G R E S D K L V Q L Y S K N T L A F A R D F K
A S M I K M G N L K P L T G R Q G E I R C H C R R I N **Stop**

Figura 7. Secuencia de amino ácidos de *Pvrip1*. M, metionina; Stop, codón de término.

El análisis *in silico* de la secuencia de amino ácidos utilizando el programa Targetp 1.1, predice con alta probabilidad la presencia de un péptido señal perteneciente a la ruta secretoria (SP=0.912) con un posible sitio de corte entre el amino ácido 29 y 30 (TPlen=29) (Figura 8). Por otra parte el análisis muestra una baja probabilidad de que se trate de una proteína de cloroplasto (0.011), de mitocondria (0.030) o de alguna otra localización (0.169). La predicción de la localización de PvRIP1, se realizó mediante el programa TMHMM, el cual indica la presencia de una pequeña región transmembranal, la cual corresponde al probable péptido señal, mientras que el resto de la proteína estaría ubicada en la región apoplástica (Figura 9).

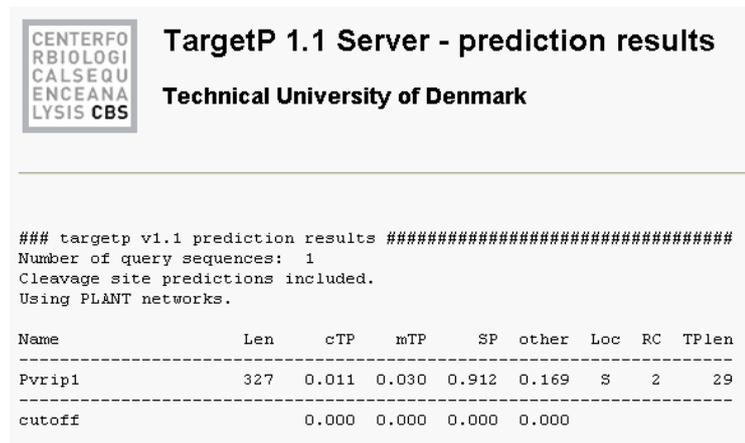


Figura 8. Predicción de la localización subcelular de PvRIP1. Len, tamaño de la secuencia de amino ácidos; cTP, proteína de cloroplasto; mTP, proteína de mitocondria; SP, proteína de la ruta secretoria; other, otra localización; Loc, localización; RC confiabilidad de la localización, donde 1 indica la predicción mas fuerte; TPlen, sitio de corte del péptido señal.

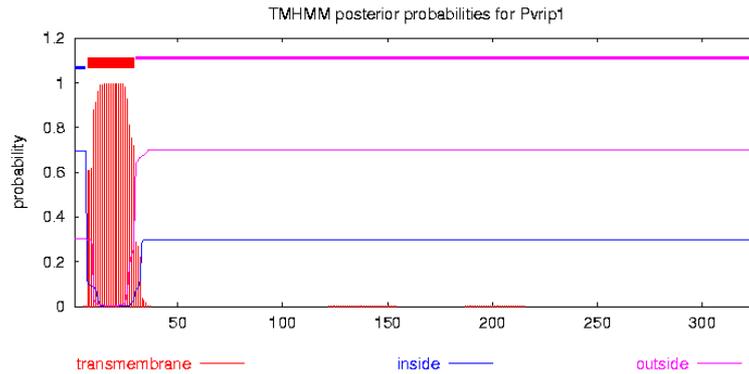


Figura 9. Predicción de posibles regiones transmembranales en PvRIP1.

Por otra parte, el estudio bioinformático de la secuencia de amino ácidos, con la ayuda del programa Clustal W (1.83) muestra que la secuencia de amino ácidos aislada de fríjol, presenta todas las características reportadas para las peroxidasas clase III de plantas (1.11.1.7), como son: el dominio con los sitios de unión al grupo hemo, el dominio con los sitios de unión a calcio, y los residuos de cisteína que forman puentes disulfuro (Welinder, 1992). El alineamiento a nivel de amino ácidos de PvRIP1 con cuatro peroxidasas reportadas durante la explosión oxidativa en plantas de fríjol expuestas a un elicitor de origen fúngico (Blee *et al.*, 2001), muestra un porcentaje de identidad de: 36% con FBP4, 43% con FBP1, 44% con FBP5 y de 50.6% con FBP3 (Figura 10). Sin embargo, el alineamiento con peroxidasas de leguminosas involucradas en otros procesos simbióticos como los descritos en *Sesbania rostrata* (SrPRX) (Den Herder *et al.*, 2006) y *M. truncatula* (MtRIP1), arrojaron un mayor porcentaje de identidad, de 57.7% y 75.2% respectivamente (Figura 10). En la Figura 11 se muestra la representación gráfica de los resultados del alineamiento realizado y mostrado en la Figura 10, en la que se ponen en evidencia los porcentajes de identidad encontrados entre las peroxidasas mencionadas. También, de acuerdo al programa NetNGlyc 1.0 Server, esta secuencia presenta 3 sitios potenciales de glicosilación en los residuos 30, 100 y 217. El peso molecular calculado para esta peroxidasa es de 33.05 kD, con un punto isoelectrico teórico de 9.66, lo cual indica que ésta es una peroxidasa catiónica (ProtParam).

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

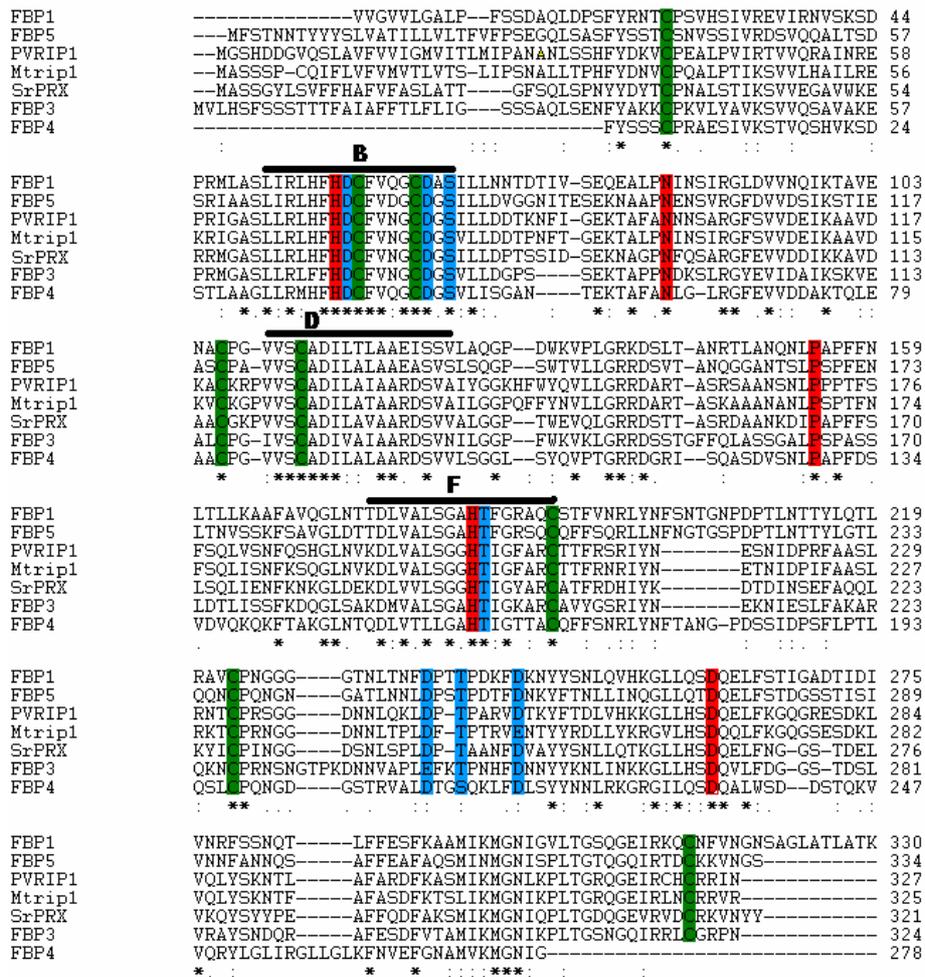


Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias deducidas de amino ácidos de PvRIP1, FBP1, FBP3, FBP4, FBP5, MtrIP1, SrPRX, utilizando Clustal W 1.83. Los porcentajes de identidad son: 43% con FBP1, 50.6% con FBP3, 36% con FBP4, 44% con FBP5, 57.7% con SrPRX y 75.2% con MtrIP1. Asteriscos (*) a. a. idénticos. Residuos de cisteína, en color verde. Sitios de unión a calcio, azul. Sitios de unión al grupo hemo, rojo. Línea horizontal representa las regiones conservadas catalíticas del dominio de unión al grupo hemo distal (B), dominio de unión al grupo hemo proximal (F), y dominios conservados de función desconocida (D) (Welinder, 1992). Los números de acceso al *Genbank* de las secuencias de las peroxidasa son: AFI49277 (FBP1), AFI49278 (FBP3), AFI49279 (FBP4), AFI49280 (FBP5), AFI49281 (FBP6), U16727 (MtrIP1) y EF055261 (SrPRX).

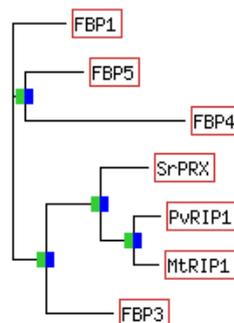


Figura 11. Representación gráfica de la Figura 10.

Determinación del número de copias de *Pvrip1* en el genoma de frijol

El número de copias de *Pvrip1* presentes en el genoma de frijol, se realizó mediante un ensayo tipo *Southern* genómico. Para ello, digerimos ADN genómico de hojas de frijol con diferentes enzimas de restricción: *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* y *EcoRV*. Al hibridar la membrana con la sonda (producto de PCR de la clona de *Pvrip1*) marcada con ³²P, encontramos una sola banda, utilizando tres de las enzimas arriba mencionadas para la digestión del ADN genómico de frijol. Con *EcoRV*, se obtuvieron dos bandas en la hibridación, lo que sugiere que este gen tiene un sitio interno de *EcoRV* (Figura 12). El análisis bioinformático de la secuencia utilizada como sonda, mediante el programa Web Cutter, confirmó que ésta presenta un sitio de restricción para la enzima *EcoRV* en la posición 811 (de 1594 residuos de la secuencia), lo cual explicaría las dos bandas observadas en el carril número 4. También mostró un sitio para la enzima *BamHI* en la posición 1159 (de 1594 residuos de la secuencia), el fragmento restante (435 residuos de la secuencia) no se observa en el experimento realizado, debido probablemente a que se salió del gel.

Localización del transcrito *Pvrip1* en las raíces de frijol

Posteriormente, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* utilizando la técnica de “*whole mount*”, para localizar el transcrito *Pvrip1* en las raíces de frijol. Utilizamos raíces de 3 días y las tratamos de acuerdo al protocolo que se menciona en Material y Métodos. Por otra parte el marcaje de la sonda se realizó, utilizando un producto de PCR de *Pvrip1* marcado con digoxigenina, el cual contenía los promotores T7 (sonda en antisentido) y T3 (sonda en sentido, utilizado como control negativo). Los resultados mostraron la ubicación del transcrito de *Pvrip1* en la zona de elongación de las raíces de frijol (Figura 13).

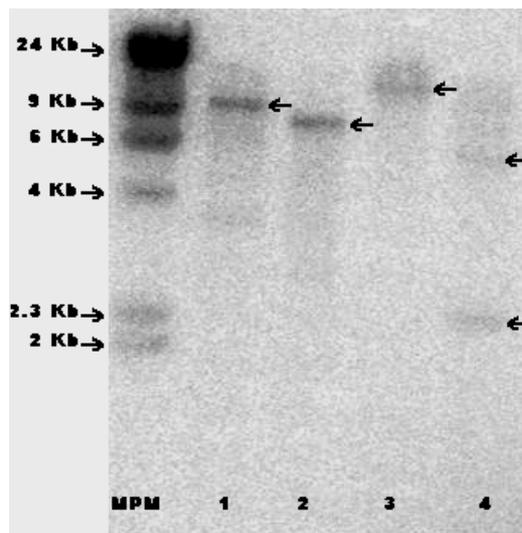
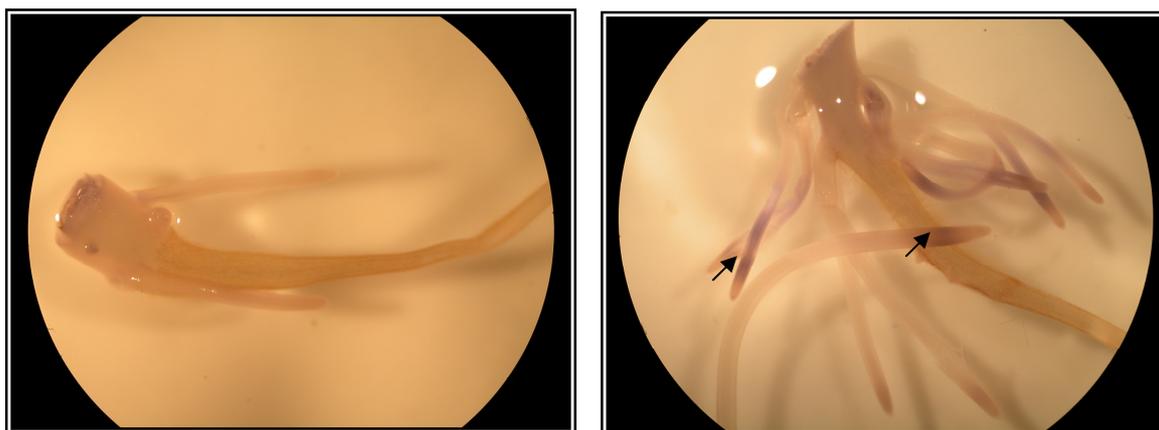


Figura 12. Ensayo tipo *Southern* genómico para determinar el número de copias de *Pvrp1* presentes en el genoma de frijol. El ADN genómico de frijol fue digerido con *EcoR1* (línea 1), *BamH1* (línea 2), *HindIII* (línea 3), *EcoRV* (línea 4). Las flechas indican las bandas que se observan de forma más evidente. MPM, es el marcador de peso molecular λ *HindI*. El producto de PCR de *Pvrp1* fue marcado con ^{32}P y utilizado como sonda.



A

B

Figura 13. Localización del transcrito *Pvrp1* en la raíces de frijol. A) Hibridación *in situ* (Whole Mount) utilizando como sonda el producto de PCR en dirección sentido (T3 control negativo) marcada con digoxigenina. B) Hibridación de la raíz con sonda marcada con digoxigenina en dirección antisentido. Las flechas indican la presencia del transcrito de *Pvrp1* en la zona de elongación tanto la raíz principal como en las raíces laterales.

Acumulación del transcrito *Pvrp1* en raíces de frijol en respuesta a diferentes tratamientos

El análisis de la acumulación del transcrito del gen *Pvrp1*, en las raíces de frijol en respuesta a diferentes tratamientos, se realizó mediante experimentos tipo *Northern* y RT-PCR. Estos ensayos se realizaron en raíces de plantas de frijol de 3 días, crecidas en medio Fåhreaus. Los ARNs extraídos, fueron la mezcla de aproximadamente 5 plantas

por cada tiempo. Estos ARNs fueron procesados de acuerdo a lo descrito en la metodología. En los ensayos tipo *Northern* se utilizó como sonda un producto de PCR de la clona de *Pvrip1* marcada con ^{32}P , mientras que en los RT-PCR se utilizaron “oligos” específicos situados en las regiones 5'UTR y 3'UTR.

Como se puede observar en la Figura 14A, *Pvrip1* presenta una expresión basal en las raíces de plantas sin tratamiento, la cual se mantuvo sin cambios notables a lo largo de los tiempos estudiados. En las raíces tratadas con factores Nod de *R. etli*, no encontramos cambios evidentes en la acumulación del transcrito durante los tiempos establecidos. Sin embargo, se puede observar un ligero aumento en la acumulación del transcrito 3 hrs después del tratamiento con los factores Nod, retomando sus niveles basales en el siguiente tiempo registrado. Es importante mencionar que el análisis de la acumulación del transcrito (ensayos tipo *Northern*) en respuesta a los factores Nod, con su respectivo control, se realizó cuatro veces, partiendo de distintas plantas, obteniendo resultados similares. Como control positivo, se analizó la acumulación del transcrito de una nodulina temprana, la ENOD40, en las raíces tratadas con los factores Nod y analizados mediante RT-PCR. Además se incluyó el análisis de la acumulación del transcrito de *Pvrip1* en el mismo experimento (Figura 15).

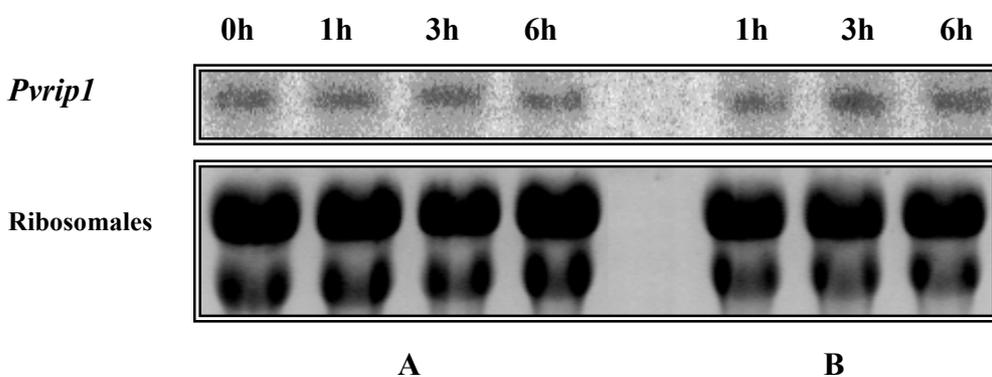


Figura 14. Análisis de la acumulación del transcrito *Pvrip1* mediante ensayos tipo *Northern*, sin tratamiento (A) y en respuesta al tratamiento con factores Nod (B). El ARN total fue extraído de 5 raíces de frijol de 3 días, y se usaron aproximadamente 18 μg de ARN por carril. Los experimentos se hicieron por cuadruplicado con resultados similares. Como sonda se utilizó un producto de PCR marcado con ^{32}P .

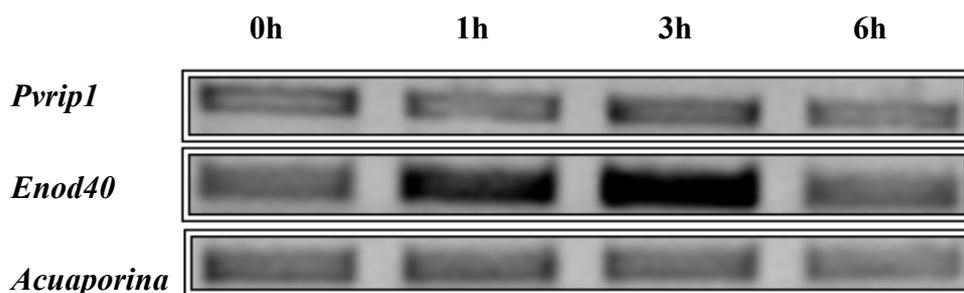


Figura15. Análisis de la acumulación del transcrito *Pvrip1* mediante ensayos tipo *Northern*, en respuesta al tratamiento con factores Nod mediante RT-PCR. Como control positivo se estudió la acumulación de la nodulina temprana ENOD40 y como control de carga el transcrito de acuaporina. El RT-PCR se realizó a partir de 2µg de ARN total extraído de 5 raíces de fríjol

Dado que se ha reportado la participación de peroxidasas Clase III de plantas durante el ataque por patógenos y en respuestas a estrés (Blee *et al.*, 2001; Delannoy *et al.*, 2003; Burbridge *et al.*, 2006; Luhova *et al.*, 2006), se decidió también analizar la respuesta en la acumulación del transcrito *Pvrip1* al tratamiento con un elicitor de tipo fúngico (lisado de pared celular de levadura donado por la Biól. Patricia Rueda) y un estrés de tipo mecánico en las raíces de fríjol. Como se muestra en la Figura 16, se puede observar un ligero incremento en la acumulación del transcrito *Pvrip1* 3 hrs después del tratamiento de las raíces de fríjol con un elicitor de tipo fúngico. Sin embargo, al tratar las raíces de fríjol con un estrés mecánico, la acumulación de *Pvrip1* no se ve afectada (Figura 16). También se trataron las raíces de fríjol con un elicitor ampliamente usado como es el quitosan, sin embargo tampoco se observaron cambios en la acumulación del transcrito *Pvrip1*. Como control positivo se analizó la acumulación del transcrito de la chalcona sintasa, el cual se sabe que se induce en respuesta a patógenos (Figura 17).

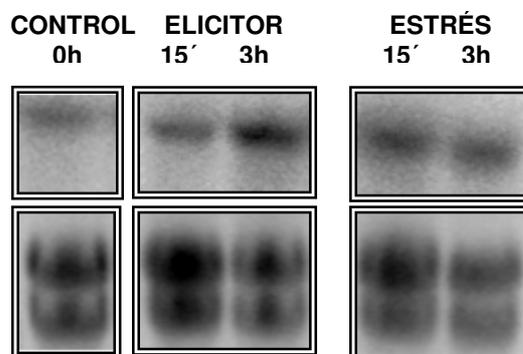


Figura 16. Análisis de la acumulación del transcrito *Pvrip1* sin tratamiento (Control) y en respuesta al tratamiento con un elicitor de tipo fúngico y la aplicación de estrés mecánico. El ARN total fue extraído de raíces de fríjol de 3 días, con aproximadamente 20µg de ARN. Los datos son el resultado de un experimento.

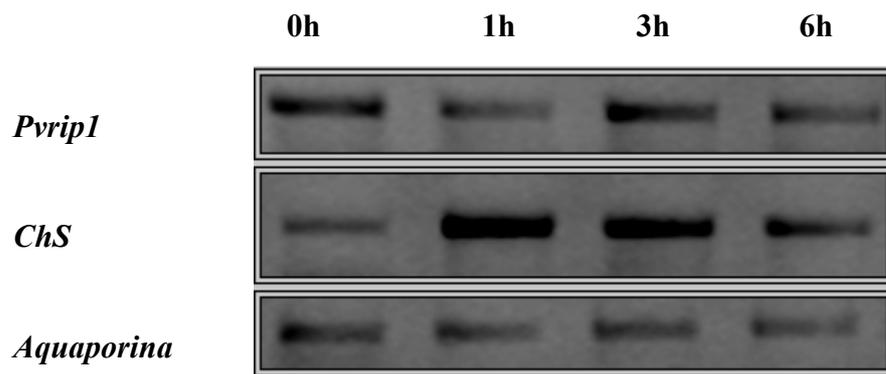


Figura 17. Análisis de la acumulación del transcrito *Pvrip1* en respuesta al tratamiento con quitosan (elicitor) mediante RT-PCR. Como control positivo se estudio la acumulación del transcrito de la chalcona sintasa y como control de carga el transcrito de aquaporina. El RT-PCR se realizó a partir de 2µg de ARN total extraído de 5 raíces de fríjol.

DISCUSION

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

LITERATURA CITADA

VI. DISCUSION

En este trabajo, nos dimos a la tarea de aislar y estudiar la posible participación de una peroxidasa durante las etapas iniciales de la simbiosis *P.vulgaris-R. etli*. Se utilizó como sonda un producto de PCR de la peroxidasa de *M. truncatula* (*Mtrip1*), para aislar el probable ortólogo en un banco de cADNs de raíces de frijol. Así, se aisló un cADN parcial, que incluye la secuencia que codifica la región central de la peroxidasa de frijol. El cADN completo, así como las regiones 5' y 3' no codificantes, se obtuvieron al analizar los EST's de frijol (previamente no disponibles) (Ramírez *et al.*, 2005), encontrando que este transcrito está descrito dentro de los EST's reportados durante la nodulación. Al realizar un BLAST con la secuencia de nucleótidos de la peroxidasa aislada en frijol, encontramos que el mayor porcentaje de identidad no se presenta con otras peroxidasas reportadas en el genoma de frijol (Blee *et al.*, 2001), tampoco con otras secuencias de peroxidasas reportadas en el banco de EST's de raíces de frijol, sino con el gen de la peroxidasa de *M. truncatula*, cuyo transcrito se ha demostrado que se induce durante las primeras horas en la simbiosis de *M. truncatula-S. meliloti* (Cook *et al.*, 1995), lo cual hace suponer que el transcrito al que llamamos *Pvrip1* podría también inducirse durante las primeras horas en la relación simbiótica de frijol y *R. etli*.

Al realizar la traducción de la secuencia de nucleótidos a amino ácidos del cADN completo de *Pvrip1*, encontramos un total de 327 residuos de amino ácidos, número similar a los 325 residuos encontrados en la peroxidasa de *M. truncatula* (Cook *et al.*, 1995) y en general con las peroxidasas clase III de plantas. El análisis *in silico* de la secuencia de amino ácidos arroja un peso molecular de 33.05 kD, muestra 3 potenciales sitios de glicosilación en los residuos 30, 100 y 217 y un punto isoeléctrico de 9.66, lo cual indica que ésta es una peroxidasa catiónica. Resultados similares han sido descritos para otras peroxidasas de plantas, ya que se han reportado pesos moleculares entre de 30 y 40 kD, con varios sitios de glicosilación y puntos isoeléctricos que pueden ser básicos, neutros o ácidos (Susumu *et al.*, 2001). Además, esta peroxidasa de frijol presenta un probable péptido señal que corresponde a la ruta secretoria, lo que ubicaría a la proteína en la región apoplástica. Existen reportes sobre la ubicación subcelular de algunas peroxidasas clase III de plantas, utilizando anticuerpos policlonales (Dalton *et al.*, 1998), ensayos de inmunohistoquímica (Delannoy *et al.*, 1998) y estudios de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP), en donde se ha encontrado que estas peroxidasas

están localizadas en el apoplasto de las células vegetales (Passardi *et al.*, 2006). La peroxidasa de frijol PvRIP1, presenta además todas las características de las peroxidases clase III de plantas, como son: el dominio de unión al grupo hemo, el dominio conservado de función desconocida, los 8 residuos de cisteína que forman los 4 puentes disulfuro y el dominio con los sitios de unión a calcio, el cual se ha demostrado que sirve para estabilizar a estas enzimas (revisado en Valderrama *et al.*, 2002).

Al realizar el alineamiento a nivel de amino ácidos de PvRIP1 con cuatro peroxidases de frijol reportadas durante la explosión oxidativa ante el ataque de un patógeno de origen fúngico (Blee *et al.*, 2001), encontramos un bajo porcentaje de identidad, no mayor al 50%, lo cual sugiere que PvRIP1 probablemente no está participando en la respuesta ante patógenos. Sin embargo, PvRIP1 mostró un mayor porcentaje de identidad con peroxidases reportadas en la simbiosis de otras leguminosas como son *S. rostrata* y, como ya se mencionó anteriormente con *M. truncatula*, lo cual sugiere que podría estar participando en la simbiosis de frijol con *R. etli*. Esta identidad es del 57.7% con SrPRX, mientras que con MtRIP1 es del 75.2%, siendo evidentemente con esta última con la que mayor porcentaje de identidad presenta, lo cual sugiere que podrían ser proteínas ortólogas. Sin embargo, se requiere evidencia experimental para validar o no esta posibilidad. Por otra parte, los datos de porcentaje de identidad refuerzan observaciones con respecto a las peroxidases en general, donde se ha visto que éstas pueden presentar un mayor porcentaje de identidad (cercano al 90%) con peroxidases de otras especies de plantas que otras peroxidases presentes en el genoma de la misma especie, lo cual indica que diversas plantas poseen peroxidases en común que podrían participar en procesos específicos, como en el caso de las leguminosas, en la simbiosis que establecen con los rizobios (Susumu *et al.*, 2001).

Los resultados del *Southern* genómico derivados del presente trabajo, sugieren que únicamente hay una copia de *Pvrip1* en el genoma de frijol, lo cual facilitará utilizar estrategias de genómica funcional que puedan ayudar a determinar el papel de PvRIP1 en las raíces de frijol.

En cuanto a la localización del transcrito *Pvrip1* en las raíces de frijol, como se mostró en los experimentos de “*whole mount*”, éste se pudo observar en la zona de elongación. Este resultado es congruente con otros datos reportados, ya que se ha demostrado que en esta región de la raíz hay una alta concentración de EOR (Ramu *et*

al., 2002). Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta ahora no podemos definir qué papel estaría desempeñando PvRIP1 en las raíces de fríjol, en cuanto a que esté generando EOR o bien detoxificándolas. Su localización en la zona de elongación de las raíces de fríjol, nos indica que podría estar participando en el desarrollo y crecimiento de células de la raíz, ya que se ha reportado la inducción de estos genes en respuesta a auxinas, en plantas de *A. thaliana* (Goda *et al.*, 2004), aunque para validar esta hipótesis sería necesario estudiar la acumulación del transcrito *Pvrip1* en respuesta al tratamiento con auxinas, así como también aislar y analizar la región promotora del gen *Pvrip1* y encontrar elementos de respuesta a auxinas. Además, se ha documentado la participación de las peroxidasas en la biosíntesis de componentes de la pared celular, y es en esta parte de la raíz donde se presenta una alta tasa de crecimiento y con ello, síntesis de pared celular (Liszakay *et al.*, 2003). La importancia de las peroxidasas en estos procesos ha sido observada en dos ecotipos de *A. thaliana*, en donde el silenciamiento de dos genes de peroxidasas (*Atprx33* y *Atprx34*), así como la mutación en uno de éstos, provoca una disminución en el tamaño de las células de la raíz, así como también una reducción en el tamaño de la misma. Sin embargo, su sobreexpresión provoca un incremento en el tamaño de las células de la raíz y en la longitud de este órgano, lo cual indica que estas peroxidasas podrían estar generando EOR para mediar el crecimiento radical (Passardi *et al.*, 2006).

Al estudiar la acumulación del transcrito *Pvrip1* en las raíces de fríjol, encontramos que hay una acumulación basal del transcrito en las raíces sin tratar. En las raíces tratadas con los factores Nod, no se encontró un cambio evidente en la acumulación del transcrito en los distintos tiempos analizados, sin embargo se observa un ligero incremento 3 hrs después, retomando su nivel basal en el siguiente tiempo registrado. Este análisis de acumulación del transcrito (ensayos tipo *Northern*) se realizó cuatro veces con resultados similares y también fue corroborado mediante RT-PCR. Sin embargo en las raíces tratadas de manera similar, sí se observó un incremento en la acumulación en el transcrito de ENOD40, que es una nodulina temprana que se ha usado como marcador del proceso de nodulación. La acumulación basal de *Pvrip1* en las raíces de fríjol, es similar a la acumulación basal encontrada de *Mtrip1* en las raíces de *M. truncatula*. No obstante, el incremento observado por Cook *et al* (1995) en las raíces de *M. truncatula* en respuesta al tratamiento con factores Nod de *S. meliloti* es evidente y éste se mantuvo durante las horas estudiadas. En cuanto a la peroxidasa

estudiada en la simbiosis *S. rostrata-Azorhizobium caulinodans*, *Srprx* (Den Herder *et al.*, 2007), el transcrito de ésta también muestra un incremento evidente en la acumulación, la cual se observa durante la primera hora después de la aplicación de los factores Nod y aumenta de forma gradual hasta 24 hrs después. Una inducción mayor del transcrito *Srprx* fue observada 12 hrs después de la inoculación bacteriana en medio hidropónico, mientras que en medio aeropónico esta acumulación se observa 3 días después.

Por otra parte, también se ha documentado la participación de las peroxidasas clase III de plantas durante algunos tipos de estrés, como son el estrés mecánico y durante el ataque de patógenos (Delannoy *et al.*, 2003, Blee *et al.*, 2001, revisado en Kawano 2003), por lo que nos dimos a la tarea de analizar la posible participación de *Pvrip1* durante estos tipos de estreses. Al tratar las raíces de tres días de frijol con un elicitor ampliamente usado en plantas como es el quitosan (oligómeros de quitina provenientes de cangrejo), no encontramos incremento en la acumulación del transcrito *Pvrip1*, sin embargo sí se observó una inducción en el transcrito de la chalcona sintasa (control positivo). Por otra parte, el tratamiento de las raíces de frijol con un elicitor de origen fúngico, mostró un incremento en la acumulación del transcrito 3 hrs después. Delannoy *et al* (2003), reportaron un incremento en la acumulación del transcrito de dos peroxidasas de algodón 2 hrs después y de otra peroxidasa 4 hrs después de haber sido tratadas con *X. campestris*. También, en plantas de frijol tratadas con un elicitor de origen fúngico, Blee *et al* (2001) encontraron un incremento en la acumulación del transcrito de dos peroxidasas 1.5 hrs después, seguida por la acumulación de los transcritos de otras dos peroxidasas, 3 hrs después y finalmente de otra 4.5 hrs después de ser tratadas. Estos resultados contrastan con los reportados en la simbiosis de *S. rostrata-A. caulinodans*, ya que no observan incrementos en la acumulación del transcrito *Srprx* después del tratamiento con elicitores de patógenos (Den Herder *et al.*, 2006).

Por otra parte, bajo un estrés de tipo mecánico, encontramos que no hay incremento en la acumulación del transcrito *Pvrip1*. Den Herder *et al.*, (2006) en la simbiosis de *S. rostrata-A. caulinodans* tampoco encontraron un incremento en la acumulación del transcrito *Srprx* en respuesta al estrés mecánico, sin embargo los tratamientos con elicitor y estrés mecánico fueron realizados en hojas de *S. rostrata* y no en raíces, que es donde se estudió su inducción en respuesta al tratamiento con los factores de nodulación.

El aumento en la acumulación del transcrito *Pvrip1* en respuesta al tratamiento con un elicitor de origen fúngico y no así en respuesta a los demás tratamientos, podría deberse probablemente a elementos regulatorios de respuesta en la región promotora de este gen, ya que diversos reportes señalan que los genes de peroxidasas Clase III de plantas, pueden presentar elementos en *cis* inducibles por H₂O₂, ABA, SA, MJ, IAA (ácido indol-acético) y etileno (Susumu *et al.*, 2001).

En el presente trabajo se aisló un cADN de frijol que codifica una peroxidasa. El análisis bioinformático de su secuencia demostró que ésta presenta todas las características reportadas para las peroxidasas Clase III de plantas, y predice que tiene una localización en la región apoplástica. Mediante *Southern* genómico encontramos que existe una sola copia de *Pvrip1* en el genoma de fríjol, mientras que la ubicación del transcrito en las raíces de fríjol, se observó en la zona de elongación. Finalmente al estudiar la acumulación del transcrito en respuesta a diferentes tratamientos, encontramos una acumulación basal del transcrito *Pvrip1* en las raíces de fríjol y un ligero incremento 3hrs después del tratamiento con los factores Nod. En respuesta al tratamiento con un elicitor de origen fúngico, observamos un incremento también ligero 3 hrs después, sin embargo no encontramos cambios en la acumulación del transcrito en respuesta a otro elicitor (quitosan) y tampoco con un estrés de tipo mecánico. El incremento ligero observado en respuesta al tratamiento con los factores Nod, coincide en tiempo con el aumento en la acumulación del transcrito en respuesta al tratamiento con el elicitor de origen fúngico, lo cual sugiere que el microsimbionte podría estar siendo detectado como un patógeno, lo cual se ha propuesto que podría estar sucediendo durante las primeras etapas de la interacción entre los rhizobios y las leguminosas (Soto *et al.*, 2006).

Estos datos en conjunto, indican que a diferencia de lo reportado en *M. truncatula* y *S. rostrata*, el transcrito *Pvrip1* no se acumula de manera evidente en respuesta al tratamiento con los factores Nod específicos. Es por ello, que consideramos que el silenciamiento o bien la sobre-expresión de este gen, sería una estrategia adecuada para determinar su función en las raíces de fríjol.

VII. CONCLUSIONES

- El cADN aislado por nuestro grupo de trabajo presenta un alto porcentaje de identidad con las peroxidasas de plantas Clase III y todas las características descritas para estas enzimas. El mayor porcentaje de identidad a nivel de a. a. (75.2%) lo presenta con la peroxidasa MtRIP1, cuyo transcrito se induce en la simbiosis *M. truncatula-S. meliloti*.
- Mediante *Southern* genómico se encontró una sola copia del gen *Pvrip1* en el genoma de fríjol.
- El transcrito *Pvrip1* se encuentra localizado en la zona de elongación de las raíces de fríjol, en cuya región se ha reportado una alta concentración de EOR.
- La acumulación del transcrito *Pvrip1* no muestra cambios evidentes en respuesta al tratamiento con los factores Nod durante los tiempos registrados, así como tampoco al elicitor quitosan y a un estrés de tipo mecánico. Sin embargo, tiene un ligero incremento en respuesta a un elicitor de origen fúngico.

VIII. PERSPECTIVAS

La recién descrita técnica de transformación en raíces de fríjol, nos permitirá realizar diferentes ensayos como son:

- Aislar y analizar la región promotora del gen *Pvrip1*.
- El silenciamiento de *Pvrip1*, lo cual ayudaría a definir su función durante las etapas iniciales de la simbiosis entre *R. etli* y fríjol.
- Realizar la localización subcelular de la proteína en las células de la raíz de fríjol, mediante la fusión a la proteína GFP.
- Detectar la generación de EOR mediante el uso de algún fluoróforo en las plantas transgénicas silenciadas en *Pvrip1*, durante los tiempos estudiados y tratar de correlacionar su producción con la probable actividad de PvRIP1.

IX. LITERATURA CITADA

Apel, K., y Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Plant Biology* 55: 373-399.

Asada K. 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* 141: 391-396.

Atlas, M. R., y Bartha, R. 1998. *Microbial Ecology fundamentals and applications*. Benjamin/Cummings Science Publishing. Fourth Edition: 108.

Bindschedler, V. L., Dewdney, J., Blee, K., Stone, J., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D., Ausubel, F., y Bolwell, P. 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal* 47: 851-863.

Blee, A. K., Jupe, C. S., Richard, G., Zimmerlin, A., Davies, R. D., y Bolwell, P. G. 2001. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*P. vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Molecular Biology*

Bolaños, V. C., y Werner, D. 1997. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. *The American Phytopathological Society* 10: 339-346.

Brock, D. T., y Madigan, T. M. 1989. *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall 5ta Edición.

Burbridge, E., Diamond, M., Dix, J. P., y McCabe F. P. 2006. Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco. *Plant Science* 171: 139-146.

Cárdenas, L. Vidali, L. Domínguez, J. Pérez, H. Sánchez, F. Hepler, PK., y Quinto, C. 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Plant Physiology* 116: 871-877.

Cárdenas, L., Feijó, A. J., Kunkel, G. J., Sánchez, F., Holdaway, C., Hepler, K. P., y Quinto, C. 1999. *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *The Plant Journal* 19: 347-352.

Cárdenas, L., Terena, L., Holdaway-Clarke, Sánchez, F., Quinto, C., Feijó, J. A., Kunkel, G. J., y Hepler, K. P. 2000. Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Update on Plant Signalling*. *Plant Physiology* 123: 443-451.

Chen, S. y Shopfer, P. 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. *European Journal of Biochemistry* 260: 726-735.

Compaan, B., Yang, W., Bisseling, T., y Franssen, H. 2001. ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*-legume interaction and the highly conserved internal of the gene does not encode a peptide. *Plant and Soil*. 230: 1-8.

Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., y VandenBosch K. 1995. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *The Plant Cell* 7: 43-55.

Corvera, A., Promé, D., Promé, J. C., Martínez, R. E., y Romero, D. 1999. The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Molecular Plant Microbe Interaction* 12: 236-246.

Dalton, A. D., Joyner, L. S., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., y Chatfield, M. J. 1998. Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules. *Plant Physiology* 116:37-43.

Delannoy, A., Jalloul, K., A., Marmey, P., Geiger, P. J., Lerminier, J., Daniel, F. J., Martínez, C., y Nicole, M. 2003. Activity of class III peroxidase in the defense of cotton to bacterial blight. *Molecular Plant Microbe Interactions* 16: 1030-1038.

Den Herder, J., Lievens, S., Holsters, M., y Goormachtig, S, 2007. A symbiotic plant peroxidase involved in bacterial invasion of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Plant Physiology* 144: 717-727.

Dos Santos, V. C., y Rey, P. 2006. Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *TRENDS in Plant Science* 11: 329-334.

Ehrhardt, W. D., Atkinson, M. E., y Long, R. S. 1992. Depolarization of Alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256: 998-1000.

Ehrhardt, W. D., Wais, R., y Long, R. S. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85: 673-681.

Esseling, J. J., Lhuissier, G. P. F., y Emons, C. A. M. 2003. Nod factor-induced root hair curling: Continuous polar growth towards the point of Nod factor application. *Plant Physiology* 132: 1982-1987.

Estrada, N. G., Alvarado, A. A., Olivares, E. J., Díaz, C. C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez, G. N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, M. P. y Sánchez, F. 2006. *Agrobacterium rhizogenes* Transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics. *Molecular Plant Microbe Interactions* 19: 1385-1393.

Felle, H. H., Kondorosi, E., Kondorosi, A, y Schultze, M. 1996. Rapid alkalinization in alfalfa roots in response to rhizobium lipoquitoligosaccharides signals. *The Plant Journal* 10: 295-301.

Felle, H. H., Kondorosi, E., Kondorosi, A, y Schultze, M. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *The Plant Journal* 13: 455-463.

Felle, H. H., Kondorosi, E., Kondorosi, A., y Schultze, M. 2000. How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. *Plant Physiology* 124: 1373-1380.

Flametakis, E., Navroulakis, N., Quaedvlieg, N. E., Spaink, H. P., Dimou, M., Roussis, A. y Katinakis, P. 2000. *Lotus japonicus* contains two distinct ENOD40 genes that are expressed in symbiotic, nonsymbiotic, and embryonic tissues. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 13: 987-994.

Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, F. H. J., Mylona, P., Miedema, H., Torre, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, G. D. J., Davies, M. J., y Dolan, L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.

Gage, D. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 280-300.

Geurts, R., y Bisseling, T. 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell* 14: S239-S249.

Groten, K., Dutilleul, C., van Heerden, R. D. P., Vanacker, H., Bernard, S., Finkemeier, I., Dietz, J. K., y Foyer, H. C. 2006. Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Letters* 580: 1269-1276.

Hansberg, W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje bioquímico volumen XXVI. Departamento de bioquímica, Facultad de Medicina UNAM.

Heo, J., y Campbell, L. S. 2006. Ras regulation by Reactive oxygen and nitrogen species. *Biochemistry* 45: 2200-2210.

Hirsch, A. M., Lum, M. R. y Downie, J. A. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?. *Plant Physiology* 127: 1484-1492.

Jebara, S., Jebara M., Limam, F., y Aouani, E. M. 2005. Changes in ascorbate peroxidase, cabalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 929-936.

Kawano, T. 2003. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* 21: 829-837.

Koca, H., Ozdemir, F., y Turkan I. 2006. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennelli*. *Biología Plantarum* 50 (4): 45-48.

Kwak, M. J., Mori, C. I., Pei, M. Z., Leonhardt, N., Torres, A. M., Dangl, L. J., Bloom, E. R., Bodde, S., Jones, G. D. J., y Schroeder, I. J. 2003. NADPH oxidase AtrbohD and

AtrbohF genes functions in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. The EMBO Journal 22: 2623-2633.

Laloi, C., Danon A., Apel, K. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. Current Opinion in Plant Biology 7: 323-328.

Lamb, C., y Dixon, A. R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual review. Plant Physiology Plant Molecular Biology. 48: 251-275.

Laus, M. C., Van Brussel, N. A. A., y Kijne, W. 2005. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. Molecular Plant-Microbe Interactions 18: 533-538.

Lee, Y. Shin, K., Kim, Y., Suh, J., Gu, Y., Kim, M., Hur, Y., Son, O., Kim, J., Song, E., Lee, S., Nam, H. K., Hwang, H. K., Sung, M., Kim, H., Chun, J., Park, M., Ahn, T., Hong, B. C., Lee, S., Park, J. H., Park, J., Verma, S. P. D., y Cheon, C. 2005. Induction of thioredoxin is required for nodule development to reduce reactive oxygen species levels in soybean roots. Plant Physiology 139: 1881-1889.

Liszak, A., Kenk, B., y Schopfer. 2003. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. Planta 217: 658-667.

Lohar, P. D., Sharopova, N., Endre, G., Pen˜ uela, S., Samac, D., Town, C., Silverstein, K., VandenBosch K, 2006a. Transcript Analysis of Early Nodulation Events in *Medicago truncatula*. Plant Physiology 140: 221-234.

Lohar, P. D., Haridas, S., Grant, S. J., VandenBosch, K. 2007. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume–rhizobia symbiosis. New Phytologist 173: 39-49.

Ludger, M., y Ursel, B. 1995. Differential accumulation of xanthenes in methyl-jasmonate and yeast-extract-treated cell cultures of *Centaurium erythraea* and *Centaurium littorale*. Planta 197: 608-612.

Luhova, L., Lebeda, A., Kutrova, E., Hedererova, D., y Pec, P. 2006. Peroxidase, cabalase, amine oxidase and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. Biologia Plantarum 50 (4): 675-682.

Matamoros, A. M., Dalton, A. D., Ramos, J., Clemente, R. M., y Becana, M. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the Rhizobia-legume symbiosis. Update on Plant Antioxidants. Plant Physiology 133: 499-509.

Miklasheviks, E., Rohrig, H., Shell, J., y Schmidt, J. 2001. Perception and signal transduction of rhizobial Nod factors. Critical Review in Plant Science. 20: 373-394.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., y Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. TRENDS in Plant Science 9: 490-498.

- Mori, C. I., y Schroeder, I. J. 2004. Reactive oxygen species activation of Plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone. Transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. Update on Reactive oxygen species activation of Ca²⁺ channels Plant Physiology 135: 702-708
- Oldroyd, D. E. G., y Downie, A. J. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. Nature 5: 566-576.
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C., y Dunad, C. 2006. Two cell wall peroxidases from *Arabidopsis thaliana* influence root elongation. Planta 223: 965-974.
- Patriarca, J. E., Taté, R., Ferraioli, S., y Iaccarino, M. 2004. Organogenesis of legume root nodules. International Review of Cytology 234: 201-262.
- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., Herouart, D., Frendo, P., y Puppo, A. 2006. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-Rhizobium symbiosis. Journal of Experimental Botany 57: 1769-1776.
- Peng, H., Dreyer, D., Vanden Bosch K., y Cook, D. 1996. Gene structure and differential regulation of the Rhizobium-induced peroxidase gene *rip1*. Plant Physiology 112: 1437-1446.
- Perret, X., Staehelin, C., y Broughton, J. W. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 180-201.
- Ramírez, M., Graham, M. A., López, B. L., Silvente, S., Medrano-Soto A., Blair, M. W., Hernández, G., Vance, P. C., y Lara, M. 2005. Sequencing and Analysis of Common Bean ESTs. Building a Foundation for Functional Genomics. Plant Physiology 137: 1211-1227.
- Ramu, K. S., Peng, H. M., y Cook, R. D. 2002. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. Molecular Plant Microbe Interaction 15: 522-528.
- Rentel, C. M., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, L. S., Peterson, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, C. S., Grierson, S. C., Hirt, H., y Knight, R. M. 2004. OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. Nature 427: 858-861.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. 2da edición. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 9.31-9.62.
- Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D., y Puppo, A. 2001. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. Molecular Plant-Microbe Interaction 14: 86-89.
- Schultze, M., y Kondorosi, A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. Annual Review of Genetics 32: 33-57.
- Shaw, L. S., y Long, R. S. 2003. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. Plant Physiology 132: 2196-2204.

Smit, G., Kijne, W. J., y Lugtenberg, J. B. 1989. Roles of flagella, lipopolysaccharide, and a Calcium-dependent cell surface protein in attachment of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* to pea root hair tips. *Journal of Bacteriology* 171: 569-572.

Soto, J. M., Sanjuán J., y Olivares, J. 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* 152: 3167-3174.

Sreevidya, V. S., Hernández-Oane, J., So, B. S., Sullia, B. S., Stacey, G., Ladha, K. J., y Reedy, M. P. 2005. Expression of the legume symbiotic lectin genes *psl* and *gs52* promotes rhizobial colonization of roots in rice. *Plant Science* 169 726-736.

Suhita, D., Raghavendra, S. A., Kwak, M. J., y Vavasseur, A. 2004. Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology* 134: 1536-1545.

Susumu, L., Katsumoto, S., Hiroyuki, I., Yuko, O., Hirokazu, M. 2001. A large family of Class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42: 462-468.

Valderrama, B., Ayala, M., y Vazquez-Duhalt, R. 2002. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and Biology* 9: 555-565.

Vasconsuelo, A., Giuletti, A. M., Boland, R. 2004. Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. *Plant science* 166: 405-413.

Welinder K. G. 1992. *Current Opinion Structural Biology* 2: 388-393

Zimmerlin, A., Przemyslaw, W., y Bolwell, P. G. 1994. Synthesis of dehydrogenation polymers of ferulic acid with high specificity by a purified cell-wall peroxidase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biochemical Journal* 299: 747-753.