



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Identificación de genes que se expresan diferencialmente en raíces de
Phaseolus vulgaris durante las etapas tempranas de la simbiosis con
Rhizobium etli.”**

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
presenta:

Karla García y García.

Cuernavaca, Morelos.

Marzo del 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la M. en IBB Carmen Quinto Hernández, en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Comité Tutorial su valiosa contribución para la realización de este trabajo y a los miembros del Jurado por sus enriquecedores comentarios. Gracias también a mis compañeras de laboratorio por toda su ayuda.

Integrantes del Comité Tutorial:

Dr. Joseph Dubrovsky.

Dra. Helena Porta.

M. en IBB Carmen Quinto.

Integrantes del Jurado:

Dr. Francisco Campos.

Dra. Berenice García.

M. en IBB Carmen Quinto.

Dr. Mario Rocha.

Dra. Svetlana Shishkova.

Compañeras de laboratorio:

M. B. Georgina Estrada.

Biol. Noreide Nava.

Dra. Margarita Rodríguez.

Dra. Rosana Sánchez.

Biol. Olivia Santana.

DEDICATORIA

A Yolanda y a Carlos,

por su cariño infinito y apoyo incondicional.

A Daniel,

por tomarme de la mano y acompañarme en el camino.

CONTENIDO

	pág.
Resumen.	1
1.-Introducción.	2
1.1.-Importancia de la simbiosis entre <i>Rhizobiaceae</i> y <i>Leguminosae</i> .	2
1.2.-Etapas en la formación del nódulo.	3
1.3.-Eventos tempranos de la simbiosis.	7
2.-Antecedentes.	10
2.1.-Estudios sobre los eventos tempranos de la simbiosis en leguminosas modelo.	10
2.1.1.-Estudios con mutantes de <i>Lotus japonicus</i> .	10
2.1.2.-Estudios con mutantes de <i>Medicago truncatula</i> .	13
2.2.-Estudios sobre perfiles de expresión génica durante la nodulación.	15
2.3.-Estudios realizados en nuestro laboratorio sobre los eventos tempranos de la simbiosis en <i>Phaseolus vulgaris</i> .	19
3.-Hipótesis.	21
4.-Objetivos.	22
Objetivo general.	22
Objetivos específicos.	22
5.-Estrategia experimental.	23
6.-Materiales y métodos.	24
6.1.-Germinación de semillas.	24
6.2.-Tratamiento con FN.	24
6.3.-Colecta de raíces.	24
6.4.-Extracción de RNA total.	25
6.5.-Síntesis de cDNA.	25
6.6.-Obtención de los EST por la técnica de SSH.	26
6.6.1.-Bases moleculares de la SSH.	27
6.7.-Construcción de la genoteca SSH.	30
6.8.- Purificación de DNA plasmídico.	30
6.9.- Análisis de restricción.	30
6.10.-PCR en colonia.	31
6.11.-Secuenciamiento de los EST.	31
6.12.-Análisis de los EST.	31
6.13.-Hibridación de DNA tipo dot-blot.	32
6.14.-Análisis estadístico del perfil de transcripción de los EST.	33
7.-Resultados.	34
7.1.-Obtención de los EST.	34
7.2.-Identificación de los EST.	37
7.3.-Perfil de transcripción de los EST.	43
8.-Discusión.	48
Sobre los EST clasificados en la categoría de metabolismo.	48
Sobre los EST clasificados en la categoría de modificación de proteínas.	52
Sobre los EST clasificados en la categoría de función desconocida.	55
Sobre los EST clasificados en la categoría de función no determinada.	56
Sobre los EST clasificados en la categoría de traducción.	56

Sobre los EST clasificados en la categoría de transporte.	57
Sobre los EST clasificados en la categoría de transcripción.	59
Sobre los EST clasificados en la categoría de regulación del estado redox.	61
Sobre los EST clasificados en la categoría de defensa.	62
Sobre los EST clasificados en la categoría de respuesta a estímulos.	63
Sobre los EST clasificados en la categoría de desarrollo.	64
9.-Conclusión.	67
Bibliografía.	68
Apéndice.	82
Mapa del pCR 2.1-TOPO.	82
Oligonucleótidos utilizados.	83
Secuencia y tamaño de los EST.	83
Niveles de expresión en unidades arbitrarias de los EST.	90

RESUMEN

En el establecimiento de la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli*, los factores de nodulación (FN) -producidos y secretados por la bacteria en respuesta a los flavonoides exudados por las raíces de la planta- son los principales responsables de los cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar en las raíces de la leguminosa, como son: el aumento del influjo de Ca^{2+} en el ápice del pelo radical, la despolarización de la membrana plasmática, la modificación del pH citosólico, la fragmentación del citoesqueleto de actina y las oscilaciones de calcio en la región perinuclear del pelo. Aunque a la fecha se han descrito algunas de las respuestas iniciales que suceden en la simbiosis, aún se desconocen muchos de los genes vegetales participantes en ellos. Con el propósito de identificar genes involucrados en los eventos tempranos de la interacción *P. vulgaris*-*R. etli*, en este trabajo se utilizó la técnica de hibridación sustractiva acompañada por PCR de supresión (SSH). Mediante esta técnica, se obtuvieron EST expresados diferencialmente en raíces de frijol horas después (1, 6 y 12 h) de que fueron expuestas a los FN. 56 EST fueron identificados y clasificados en las siguientes categorías funcionales: metabolismo (19%), modificación de proteínas (16%), función desconocida (14%), función no determinada (13%), traducción (9%), transporte (7%), transcripción (7%), regulación del estado redox (5%), defensa (4%), respuesta a estímulo (4%) y desarrollo (2%). Los resultados aquí obtenidos dan una idea sobre el tipo de genes que se están expresando durante las primeras horas de la simbiosis; la caracterización funcional de estos, permitirá determinar el papel que podrían tener en el proceso simbiótico.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-Importancia de la simbiosis entre *Rhizobiaceae* y *Leguminosae*.

La familia *Leguminosae* incluye 643 géneros con alrededor de 18,000 especies distribuidas tanto en regiones tropicales como templadas. Las leguminosas son de los cultivos más extendidos a nivel mundial y han sido utilizadas no sólo para consumo humano sino también como forraje para animales. *Vigna unguiculata*, *Glycine max* (soya) y *Phaseolus vulgaris* (frijol) son las leguminosas más comercializadas en el mundo. Otras especies ampliamente cultivadas son: *Cicer arietinum* (garbanzo), *Medicago sativa* (alfalfa), *Lens culinaris* (lenteja), *Pisum sativum* (chícharo) y *Vicia faba* (haba). En México, *P. vulgaris* representa la principal ingesta de proteínas en la dieta (Broughton, *et al.*, 2003).

El nutriente limitante en los cultivos es el nitrógeno, ya sea como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+). Una manera de contender con la limitación de nitrógeno en el suelo, es haciendo uso de fertilizantes. Esto implica altos costos de producción, además de que el uso desmedido de compuestos nitrogenados acarrea problemas ambientales, como la contaminación atmosférica debida a la volatilización de óxidos de nitrógeno, la contaminación de mantos freáticos y otros cuerpos de agua por lixiviación de nitratos y en general, alteración del ciclo global del nitrógeno (Arp, 2000).

Otra forma en que las plantas obtienen compuestos nitrogenados es a través de la fijación biológica de nitrógeno. El dinitrógeno atmosférico (N_2) no puede ser asimilado directamente por todos los organismos ya que el enlace que une a ambos átomos es muy estable y difícil de romper; cuando ambos átomos son separados y combinados (fijados) con otros elementos, el N_2 resulta fácilmente asimilable. El N_2 es fijado exclusivamente por organismos procariontes que contienen al complejo enzimático nitrogenasa (responsable de la conversión del N_2 a NH_4^+). Los procariontes fijadores de N_2 pueden vivir libremente o formar asociaciones simbióticas con plantas; entre las asociaciones más estudiadas, se encuentra la relación entre bacterias de la familia *Rhizobiaceae* (*Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*) y plantas de la familia *Leguminosae*. Esta asociación está caracterizada por la

formación de nódulos, estructuras especializadas en las raíces de la planta, donde se lleva a cabo la fijación de N_2 ; el NH_4^+ resultante es exportado hacia la planta para su asimilación y la planta en reciprocidad provee a la bacteria de compuestos carbonados (Sprent, 1994).

Después de la fotosíntesis, la adquisición y asimilación de compuestos nitrogenados es uno de los procesos fisiológicos más importantes en las plantas. Si se trata de cultivos con importancia agrícola, este proceso es relevante ya sea para aumentar su productividad o mejorar su contenido proteico. De ahí que el estudiar cómo se lleva a cabo la nodulación en leguminosas sea de gran interés.

1.2.-Etapas en la formación del nódulo.

Reconocimiento entre simbiosis. Las plantas liberan continuamente grandes cantidades de compuestos orgánicos a la rizósfera como: agua, iones, enzimas, mucílago, metabolitos carbonados, aminoácidos, compuestos fenólicos, etc., la mayoría de los cuales mantienen a la comunidad microbiana circundante; pero son ciertos compuestos aromáticos llamados flavonoides los que actúan como quimioatrayentes de los rizobios, concentrándolos en la superficie del ápice de los pelos radicales, iniciando así el diálogo molecular planta-bacteria (Bais, *et al.*, 2006). Los simbiosis bacterianos reconocen a los flavonoides específicos a través de las proteínas NodD -activadoras transcripcionales- que después de reconocer e interactuar con los flavonoides, inducen la expresión de los genes rizobiales *nod* requeridos para la síntesis de los FN. Los FN actúan a su vez como moléculas señal y son reconocidas específicamente por la leguminosa compatible (fig. 1). Los FN inducen en la raíz de la leguminosa cambios fisiológicos y morfológicos que conducen a la formación del nódulo (Perret, *et al.*, 2000).

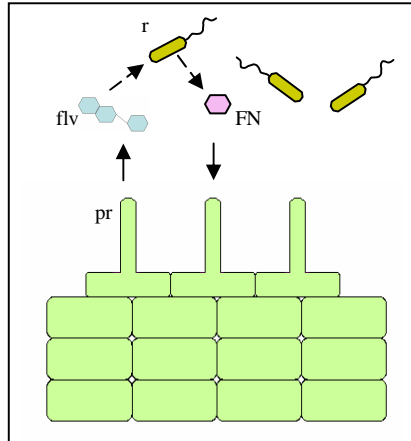


Fig. 1.- Reconocimiento entre simbioses. La inducción de genes rizobianos *nod*, requiere de flavonoides exudados por las raíces de la planta. flv, flavonoide; FN, factor Nod; pr, pelo radical; r, rizobio.

Adhesión de rizobios al pelo radical. Para que la infección inicie, la superficie celular bacteriana tiene que estar en contacto con el ápice del pelo radical (fig. 2). Se han propuesto varios mecanismos y diferentes moléculas de superficie, mediante las cuales las bacterias pueden adherirse al ápice del pelo:

Lectinas.-Entre las principales moléculas que participan en esta adhesión están las lectinas, las cuales son proteínas vegetales que contienen por lo menos un dominio de unión reversible a mono u oligosacáridos. Aunque las lectinas están concentradas principalmente en el ápice de los pelos radicales, se encuentran en toda la superficie de la raíz y en otros órganos de la planta (Hirsch, 1999). Polisacáridos de la superficie de las bacterias como glucanos cíclicos o glucomananos, podrían estar siendo reconocidos específicamente por las lectinas (Hirsch, 1999; Laus, *et al.*, 2006).

Ricadhesinas.-Son proteínas bacterianas de unión a Ca^{2+} que posiblemente participan en la unión del rizobio a la superficie del pelo radical. El Ca^{2+} está involucrado en el anclaje de las ricadhesinas a la superficie celular bacteriana, concentrando estas proteínas en los polos de la célula. Células de *Rhizobium leguminosarum* cultivadas en condiciones limitantes de Ca^{2+} tienen menos capacidad de unión al pelo radical (Smit, *et al.*, 1989, 1991). La ricadhesina sólo ha sido

purificada de *R. leguminosarum* (aunque en otros rizobios se han encontrado proteínas que comparten sus propiedades) y aún no se ha identificado al gene que la codifica (Gage, 2004).

Fibras de celulosa.- Otro mecanismo adicional de unión rizobio-leguminosa es a través de fibrillas de celulosa producidas por la bacteria. Aunque esta unión es fuerte e irreversible no es un requisito indispensable para que esta ocurra (Smit, *et al.*, 1987).

Formación del hilo de infección. Después de la unión de los rizobios al ápice del pelo radical, este se deforma y se curva atrapando a las bacterias en una región conocida como punto de infección (fig. 2). En este punto la pared celular vegetal es hidrolizada (no se sabe con certeza cuál simbiote es responsable de tal hidrólisis, ya que los rizobios tienen enzimas que pueden degradar tanto celulosa como polisacáridos de pared y las plantas también tienen la capacidad de alterar su propia pared celular) y la membrana plasmática se invagina dando lugar a una estructura tubular en cuyos márgenes se deposita nueva pared celular vegetal para formar el hilo de infección. Contenidos en el hilo de infección, los rizobios están rodeados de polisacáridos donde crecen y dividen mientras el hilo se elonga dirigiendo a las bacterias hacia el córtex de la raíz. Se cree que exopolisacáridos bacterianos (además de FN) pueden estar jugando un papel importante en el avance del hilo hacia el interior de la raíz, pero aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares involucrados en la formación y extensión del hilo de infección, así como de los eventos moleculares relacionados con los rearrreglos del citoesqueleto en la célula (Hirsh, *et al.*, 2001; Gage, 2004).

Formación del primordio nodular. Conforme el hilo de infección se va elongando, en respuesta a los FN las células corticales reinician su ciclo celular para formar el primordio de nódulo en donde se alojarán las bacterias (fig. 2). El hilo de infección se extiende progresivamente ramificándose entre el córtex de la raíz y el primordio del nódulo, las bacterias son endocitadas al interior de las células hospederas a partir de una vesícula que se desprende del hilo de infección (Taté, *et al.*, 1994; Gage, 2004).

El patrón de desarrollo de los nódulos puede ser indeterminado o determinado dependiendo de la especie de leguminosa. Ambos tipos de nódulos tienen haces vasculares periféricos y un tejido

central con células infectadas y no infectadas. En los nódulos indeterminados (por ejemplo, *Medicago truncatula* y *M. sativa*) existe un gradiente de desarrollo que va desde un meristemo distal persistente hasta una región proximal senescente, el tejido central entre ambas regiones se divide en zonas específicas. Por debajo del meristemo está la zona de prefijación donde las células son infectadas; luego la interzona, en la que se induce la fijación de N_2 y finalmente la zona senescente donde los bacteroides son degradados por la planta (Vasse, *et al.*, 1990). En los nódulos determinados (por ejemplo, *P. vulgaris* y *Lotus japonicus*) no hay meristemo persistente, todas las células del córtex proliferan, diferencian y senescen sincronizadamente (Taté, *et al.*, 1994).

Nódulo maduro. Los primordios nodulares se convierten en nódulos maduros cuando las bacterias que han sido liberadas al interior de las células vegetales se diferencian en bacteroides, formas funcionales fijadoras de N_2 (fig. 2). En nódulos indeterminados la diferenciación de bacteria a bacteroide implica endoreduplicación genómica sin citoquinesis, lo que ocasiona que los bacteroides sean mucho más grandes y aunque metabólicamente son funcionales, no se consideran viables porque no pueden reasumir su crecimiento. En nódulos determinados los bacteroides son similares en contenido genómico, tamaño y viabilidad a las bacterias en vida libre. Dado que la diferenciación a bacteroide es distinta en los dos tipos de nódulos, se piensa que la célula vegetal puede estar controlando en gran parte este proceso (Mergaert, *et al.*, 2006). Los bacteroides permanecen rodeados ya sea individualmente o en pequeños grupos por una membrana peribacteroidal originada a partir de la membrana vegetal (Verma, 1992; Catalano, *et al.*, 2007). La membrana peribacteroidal constituye la interface entre la célula vegetal y la bacteria, controla el intercambio de nutrientes entre ambas y previene una respuesta de defensa contra la infección. Al conjunto de bacteroide, espacio peribacteroidal y membrana peribacteroidal se le denomina simbiosoma (Verma, 1992). El simbiosoma proporciona el ambiente microaeróbico necesario para que los bacteroides expresen las enzimas del complejo nitrogenasa y se lleve a cabo la fijación de N_2 . El NH_4^+ producido por la nitrogenasa es exportado hacia el citoplasma de la célula vegetal y la planta provee a la bacteria ácidos dicarboxílicos para que pueda sustentar toda la maquinaria de la fijación de N_2 (Udvardi y Day, 1997).

Senescencia del nódulo. La membrana peribacteroidal puede ser considerada como un compartimento lítico que es neutralizado por la exportación de NH_4^+ hacia la planta. Conforme aumenta el número de bacteroides empaquetados en un mismo simbiosoma, la superficie de intercambio metabólico y de O_2 entre la célula hospedera y bacteroides se reduce y no es suficiente para sostener las mínimas funciones vitales; la viabilidad de los bacteroides disminuye y dejan de fijar N_2 , sin NH_4^+ las proteasas presentes en la membrana peribacteroidal favorecen la degradación de los bacteroides. Las bacterias no diferenciadas que han permanecido en el hilo de infección son liberadas al suelo (Hirsch y Smith, 1987; Cermola, *et al.*, 2000).

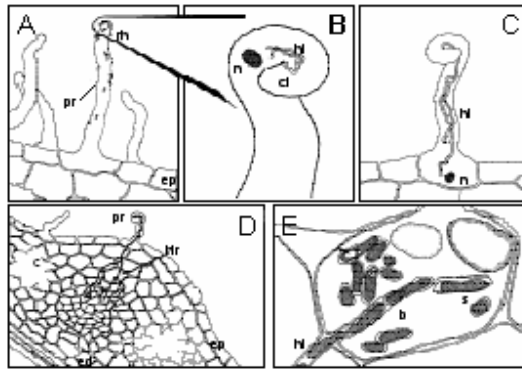


Fig. 2.- Etapas en la formación del nódulo. A, adhesión de rizobios al pelo radical; B, curvamiento del pelo y formación del hilo de infección a partir del centro de infección; C, elongación del hilo de infección; D, división de células corticales y penetración del hilo; E, célula infectada en un nódulo maduro. b, bacteroide; c, córtex; ci, centro de infección; ed, endodermis; ep, epidermis; hi, hilo de infección; hir, hilo de infección ramificado; n, núcleo; pr, pelo radical; rh, rizobio; s, simbiosoma (figura modificada de Perret, *et al.*, 2000).

1.3.-Eventos tempranos de la simbiosis.

En los últimos años ha habido un gran interés por estudiar qué sucede en los eventos tempranos de la nodulación. Se ha propuesto que la planta reconoce FN específicos a través de receptores de alta afinidad, tales receptores dispararían una cascada de señalización que conduciría a cambios morfológicos en los pelos radicales y a cambios en la expresión de genes involucrados en el desarrollo y mantenimiento del nódulo.

Para el inicio de la comunicación planta-bacteria se requiere que los compuestos flavonoides sean liberados a la rizósfera por las raíces de la leguminosa, los cuales actúan como quimioatrayentes bacterianos y son específicos para disparar la expresión de genes rizobianos requeridos para la nodulación. La capacidad de inducción varía con el tipo de flavonoide y la especie de rizobio, incluso algunos flavonoides pueden inhibir la inducción de genes bacterianos (Perret, *et al.*, 2000). Los flavonoides son derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona, su estructura está definida por dos anillos aromáticos A, B y un anillo pirano heterocíclico, C. Modificaciones específicas de esta estructura básica producen diferentes clases de flavonoides. Comparando las estructuras de distintos flavonoides que inducen la expresión de genes *nod* en diferentes rizobios, se ha encontrado que hidroxilaciones en posiciones específicas son importantes para la inducción de los genes bacterianos. Además de los flavonoides, existen otros quimioatrayentes e inductores de los genes *nod* en los rizobios como algunos compuestos nitrogenados llamados betaínas y otros compuestos fenólicos simples (Brencic, *et al.*, 2005). Las raíces de *P. vulgaris* exudan a la rizósfera tres tipos de flavonoides, eriodictiol, naringenina y genisteína (fig. 3), siendo los dos últimos los que inducen principalmente la expresión de genes *nod* en *Rhizobium etli* (Hungria, *et al.*, 1991).

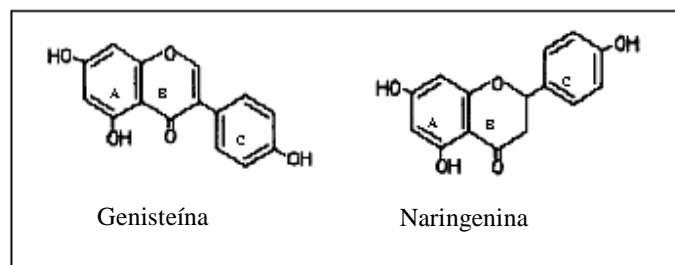


Fig. 3.- Estructura de los principales flavonoides exudados por raíces de *P. vulgaris* que inducen la expresión de los genes *nod* en *R. etli*.

Como respuesta a los flavonoides apropiados, la bacteria sintetiza y secreta a los FN. La estructura básica de los FN producidos por diferentes rizobios es muy similar, consiste en un esqueleto de 4 o 5 residuos de *N*-acetil-*D*-glucosamina unidos a través de enlaces β -1,4; el nitrógeno del residuo terminal no reductor lleva unido un ácido graso cuya estructura puede variar dependiendo de la especie bacteriana además, pueden estar presentes distintas

sustituciones en los residuos terminales reductor y no reductor (fig. 4). *R. etli*, sintetiza mayoritariamente pentasacáridos de *N*-acetilglucosamina cuyo extremo no reductor está *N*-metilado y *N*-acilado con ácido *cis*-vaccénico (C18:1) o ácido esteárico (C18:0), posee un grupo carbamilo en C4 y el extremo reductor está sustituido en la posición C6 con *O*-acetilfucosa (Cárdenas, *et al.*, 1995).

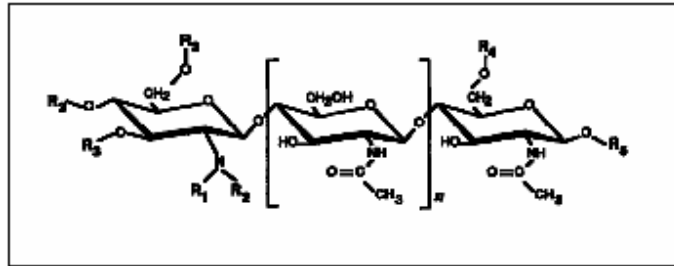


Fig. 4.- Estructura general de los FN. n, grado de oligomerización; R1-R5, diversos sustituyentes químicos (pueden ser grupos metilo, sulfato, carbamilo, etc).

Después de que los pelos radicales perciben a los FN suceden varios eventos tempranos: aumenta la concentración de Ca^{2+} en su ápice (Cárdenas, *et al.*, 1999), su membrana plasmática se despolariza, el pH citosólico se modifica (Felle, *et al.*, 1998), hay rearrreglos en el citoesqueleto de actina (Cárdenas, *et al.*, 1998) y la pared celular se remodela antes de que el pelo se deforme, se curve e inicie la formación del hilo de infección. Además de los cambios que suceden en los pelos radicales como resultado de la percepción de los FN, se ha reportado la expresión de nodulinas vegetales relacionadas con la formación y mantenimiento del nódulo (Matvienko, *et al.*, 1994; Ben Amor, *et al.*, 2003).

2.-ANTECEDENTES

2.1.-Estudios sobre los eventos tempranos de la simbiosis en leguminosas modelo.

La relación simbiótica entre leguminosas y rizobios es un fenómeno muy interesante desde el punto de vista biológico y agrícola, por lo que es importante dilucidar la biología de este proceso. Se conoce poco sobre los eventos llevados a cabo durante las fases tempranas de la nodulación; sin embargo, destaca la caracterización de genes clave relacionados con la percepción de los FN y con los primeros pasos de la vía de transducción de señales que tiene que ver con el inicio de la formación del nódulo. A la fecha en las leguminosas modelo *L. japonicus* y *M. truncatula* se ha generado una gran colección de mutantes simbióticas, donde se han buscado aquellas que están bloqueadas en los primeros pasos de la simbiosis (tabla 1), con el propósito de estudiar el funcionamiento de la vía de transducción de la señal disparada por la percepción de los FN (Gough, 2003).

Tabla 1.- Algunas proteínas participantes en la vía de señalización inducida por los FN en las leguminosas modelo *L. japonicus* y *M. truncatula*.

<i>Lotus japonicus</i> (proteína)	<i>Medicago truncatula</i> (proteína ortóloga)	Posible Función
LjNFR5	MtNFP	Receptor de FN
LjNFR1	MtLYK3, MtLYK4	Receptor de FN
LjSYM RK	MtDMI2	Receptor cinasa con repetidos ricos en Leu
LjCASTOR y POLLUX	MtDMI1	Canal iónico
LjNUP133	Desconocida	Nucleoporina
LjSYM15	MtDMI3	Cinasa dependiente de Ca ²⁺ /CaM
LjNSP1	MtNSP1	Regulador transcripcional GRAS
LjNSP2	MtNSP2	Regulador transcripcional GRAS

2.1.1.-Estudios con mutantes de *Lotus japonicus*.

Los pelos radicales de las mutantes *nfr1* y *nfr5* de *L. japonicus* no presentan aumento en el influjo de Ca²⁺, despolarización de la membrana plasmática, ni oscilaciones de Ca²⁺ en la zona perinuclear y tampoco presentan deformación ni enroscamiento. Esto sugiere que NFR1 y NFR5 actúan en eventos tempranos de la interacción con la bacteria y están involucrados en la

percepción de los FN. NFR1 y NFR5 contienen dominios tipo LysM que en otros organismos están presentes en proteínas que unen polisacáridos tipo quitina (el esqueleto principal de los FN es de tipo quitina). NFR1 tiene en el extremo amino terminal dos dominios tipo LysM, mientras que en el extremo carboxilo terminal contiene motivos similares a serina/treonina cinasas, entre ambos dominios hay un segmento transmembranal que podría servir al receptor para anclarse en la membrana plasmática (Radutoiu, *et al.*, 2003). NFR5 contiene en el extremo amino terminal tres motivos similares al dominio LysM y en el dominio cinasa intracelular tiene motivos asociados con serina/treonina cinasas. Se considera miembro de una nueva familia de receptores transmembranales tipo cinasas que carecen del lazo de activación. En las cinasas al ser fosforilado el lazo de activación, el sitio activo queda disponible para los sustratos, la falta de un lazo de activación sugiere que la cinasa NFR5 es activa una vez que el ligando se ha unido al dominio extracelular (Madsen, *et al.*, 2003). La percepción de los FN no sólo induce cambios morfológicos en los pelos radicales, también induce la expresión de genes simbióticos como *NIN* (que codifica un regulador transcripcional requerido para la formación del hilo de infección y el inicio del primordio nodular) y *ENOD2* (que codifica una proteína rica en hidroxiprolina expresada en células del parénquima del nódulo) de modo que NFR1 y NFR5 no sólo participan en la percepción primaria de los FN sino también de forma indirecta en la invasión de tejido vegetal y en el desarrollo del nódulo. Se ha propuesto que NFR1 y NFR5 podrían estar ensambladas formando un receptor heterodimérico (Radutoiu, *et al.*, 2003).

Por otra parte, pelos radicales de mutantes en *SYMRK* de *L. japonicus*, muestran aumento de volumen y bifurcación como respuesta a la inoculación con *Mesorhizobium loti*, pero no enroscamiento ni formación del hilo de infección. Esto indica que los pelos radicales aún son capaces de detectar la presencia de los FN bacterianos a través de proteínas que actuarían corriente arriba de *SYMRK* o en alguna vía alterna. *SYMRK* tiene un dominio extracelular con tres repetidos ricos en leucinas (LRRs) que podrían participar en interacciones proteína-proteína, también tiene un dominio transmembranal y un dominio cinasa intracelular. Datos genéticos sugieren que este receptor podría actuar entre el reconocimiento de los FN y la activación de las oscilaciones de calcio (Stracke, *et al.*, 2002). La estructura de esta proteína permite proponer que su dominio extracelular está involucrado en el reconocimiento de un ligando señal aún no determinado, mientras que su dominio intracelular serina/treonina cinasa podría ser clave para la

función de SYMRK en la simbiosis; esto con base en que se ha visto que mutaciones en este sitio impiden la nodulación. El dominio intracelular es responsable de llevar a cabo una autofosforilación intermolecular lo que aumenta su actividad catalítica, SYMRK al autofosforilarse, transduciría la percepción de la molécula señal a blancos situados corriente abajo (Yoshida y Parniske, 2005).

Relacionados también con las respuestas tempranas del establecimiento de la simbiosis, se han identificado en mutantes de *L. japonicus* dos genes homólogos, *CASTOR* y *POLLUX*. Cuando los pelos radicales de plantas mutadas en estos genes son expuestos a FN purificados o a *M. loti* sólo muestran hinchamiento y bifurcación, pero no enroscamiento o formación del hilo de infección, intracelularmente tampoco se presentan las oscilaciones de calcio que se observan luego de 10 min de inoculación en la planta de tipo silvestre (Imaizumi-Anraku, *et al.*, 2005). *CASTOR* y *POLLUX* son similares en cuanto a secuencia, una mutación en cualquiera de los dos causa un fenotipo simbiótico anormal, por lo que se ha sugerido que las proteínas que codifican estos genes pudieran estar formando dos homocomplejos independientes. *CASTOR* y *POLLUX* son canales iónicos permeables a potasio. *CASTOR* se localiza perinuclearmente (posiblemente también *POLLUX*), aunque no se sabe si se localiza en la membrana interna del núcleo, en la membrana externa o en ambas (Charpentier, *et al.*, 2008).

Otra mutante de interés en *L. japonicus* es *nup133* ya que presenta fenotipo no nodulante. Cuando *nup133-1* es inoculada con *M. loti* sólo presenta hinchamiento de los pelos radicales (lo cual indica que hay percepción de los FN) pero no bifurcación ni enroscamiento, tampoco hay aumento en el influjo de Ca^{2+} ni oscilaciones de este ión en la periferia del núcleo. El gen *NUP133* codifica para una nucleoporina que podría estar involucrada en las oscilaciones de Ca^{2+} nucleares. Esta expresión no es exclusiva de raíz ya que el transcrito también se encuentra en otros tejidos de la planta, la mutación parece afectar sólo a la nodulación y a la asociación simbiótica con micorrizas puesto que otros aspectos fisiológicos de la planta no se ven afectados (Kanamori, *et al.*, 2006).

2.1.2.-Estudios con mutantes de *Medicago truncatula*.

En *M. truncatula* al estudiar a qué nivel están afectadas mutantes incapaces de formar nódulos (fenotipo Nod⁻), se ha encontrado que tal incapacidad está relacionada con un bloqueo en las respuestas tempranas luego de la percepción de los FN. En las mutantes *dmi1*, *dmi2* y *dmi3* al inocularlas con *Sinorhizobium meliloti* los pelos radicales presentan hinchamiento pero no ramificación, no hay hilos de infección, las células del córtex no se dividen y tampoco hay expresión de genes simbióticos asociados a eventos tempranos de la nodulación. En *dmi1* y *dmi2* no se observan las oscilaciones de Ca²⁺ en la región perinuclear del pelo radical, mientras que en *dmi3* tales oscilaciones son semejantes a las que tienen lugar en la planta silvestre. Lo anterior sugiere que los tres genes pueden ser situados en una jerarquía tal, que en la cascada de señalización DMI1 y DMI2 están por arriba de DMI3 y dado que las oscilaciones de Ca²⁺ son parte importante de esta cascada, DMI3 estaría involucrada en la transducción de la señal derivada de tales oscilaciones hacia blancos situados corriente abajo (Wais, *et al.*, 2000).

DMI1 consta de cuatro dominios transmembranales, los dos primeros comprenden un dominio rico en prolina y un dominio de zíper de leucinas que podrían facilitar la interacción de esta proteína con otras (posiblemente formando parte de un complejo multimérico), el tercer dominio transmembranal es homólogo al canal de potasio MthK activado por calcio (Ané, *et al.*, 2004). DMI1 es ortólogo de CASTOR y POLLUX de *L. japonicus* y en pelos radicales de *M. truncatula* se localiza en la región perinuclear (Riely, *et al.*, 2007). DMI1 no es directamente responsable de las oscilaciones de Ca²⁺ pero podría estar participando en la regulación de otros canales que liberarían este ion de reservas internas (Peiter, *et al.*, 2007).

DMI2 pertenece a la familia de receptores tipo cinasa (RLK) con dominios extracelulares que contienen tres regiones ricas en leucina y es ortólogo de SYMRK de *L. japonicus* (Endre, *et al.*, 2002). La expresión de *DMI2* es abundante en el ápice del nódulo debajo del meristemo, donde las bacterias son liberadas de los hilos de infección a las células de la planta. La proteína está localizada en la membrana plasmática de las células vegetales y en la membrana que rodea a los hilos de infección. Si se reduce la expresión de *DMI2* (por RNAi) en plantas que ya han desarrollado nódulos, se puede observar ramificación excesiva de los hilos y aumento en su

diámetro, así como ausencia de simbiosomas; por ello DMI2 es componente esencial en el establecimiento y mantenimiento del nódulo (Limpens, *et al.*, 2005).

La mutante *dmi3* de *M. truncatula* muestra un fenotipo similar a *dmi1* y *dmi2*, salvo que en esta mutante si hay oscilaciones de Ca^{2+} en el citoplasma. La proteína que codifica este gen pertenece al grupo de serina/treonina cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina (CCaMK). El dominio N-terminal tiene actividad de cinasa, mientras que el C-terminal es un dominio regulador de unión a Ca^{2+} ; entre los dominios cinasa y de unión a Ca^{2+} hay un dominio de unión a calmodulina que se sobrepone a un dominio autoinhibidor (Lévy, *et al.*, 2004; Mitra, *et al.*, 2004a, b). El sistema de regulación de DMI3 consiste en que iones libres de Ca^{2+} inducen la autofosforilación de la proteína lo que aumenta su unión a Ca^{2+} -CaM, lo cual a su vez promueve la fosforilación del sustrato y suprime la autoinhibición. Deleciones del dominio CaM/autoinhibidor provocan la fosforilación constitutiva del sustrato; es decir, se autoactiva la cascada de señalización en la planta, activando la expresión de genes de nodulación que conducen al desarrollo de los nódulos (Gleason, *et al.*, 2006).

Entre los genes participantes en los últimos pasos, hasta ahora descritos, de la cascada de señalización inducida por la percepción de los FN están *NSP1* y *NSP2* de *M. truncatula*. Mutaciones en estos genes no afectan la deformación de los pelos radicales, el influjo de Ca^{2+} , ni las oscilaciones de este ion en la zona nuclear; sin embargo, no hay formación del hilo de infección, ni división de las células corticales, ni expresión de nodulinas. *NSP1* y *NSP2* son similares a proteínas de la familia GRAS específicas de plantas. Miembros de esta familia son reguladores de la transcripción al controlar distintos procesos celulares y del desarrollo en otras especies vegetales. El dominio GRAS tiene en la porción C-terminal regiones ricas en leucina (lo que indica que podría interactuar con otras proteínas) y en la porción N-terminal tiene residuos que se han encontrado presentes en factores de transcripción. Por todo ello, además de localizarse en núcleo, se considera que *NSP1* y *NSP2* podrían ser reguladores transcripcionales de genes de respuesta a los FN. *NSP1* y *NSP2* no son redundantes y podrían actuar cooperativamente; también queda por demostrar si DMI3 podría activar a estos reguladores transcripcionales (Kaló, *et al.*, 2005; Smit, *et al.*, 2005; Udvardi y Scheible, 2005).

2.2.-Estudios sobre perfiles de expresión génica durante la nodulación.

A la fecha, diversos grupos de investigación han impulsado proyectos genómicos con el fin de identificar genes vegetales involucrados en la simbiosis y dilucidar cómo es la regulación de las distintas etapas de la formación del nódulo, desde el comienzo de la infección, hasta la fijación de N₂. Para ello, ha sido crucial el análisis de expresión de transcritos mediante diferentes herramientas (macro y microarreglos, análisis *in silico*, expresión diferencial, hibridación sustractiva, entre otros).

El primer arreglo de cDNA de nódulos de leguminosas fue realizado por Colebatch, *et al.* (2002). Se secuenciaron alrededor de 5000 clonas provenientes de bancos de cDNA de nódulos de *L. japonicus*, de las que 2304 clonas (que representan 1500 genes distintos) fueron utilizadas para comparar los niveles de transcritos entre nódulos y raíces no infectadas de plantas de 7 semanas. Los transcritos de 83 genes distintos fueron más abundantes en nódulo que en raíz y al asignar funciones a los productos codificados por esos genes, encontraron que el 35% participa en el metabolismo primario y el metabolismo secundario, el 12% está relacionado con la expresión génica y la transducción de señales, el 10% son nodulinas previamente identificadas, el 6% están involucrados en pared celular y crecimiento celular, el 1.2% participan en defensa, el 4% participan en el metabolismo de hormonas, el 5% se relacionan con transporte en membrana, el 2.4% participan en síntesis y procesamiento de proteínas y el 24% tiene funciones diversas, entre los que se encuentran cinco proteínas cuyos genes codificantes no fueron identificados y que podrían ser exclusivos de leguminosas ya que no se encontraron genes similares en las bases de datos públicas. En otro trabajo más profundo de este mismo grupo de investigación, se aumentó el número de genes representados en el arreglo de cDNA y se identificaron cerca de 860 genes inducidos significativamente en nódulo. La mayor parte (28%) codifica para proteínas involucradas en metabolismo y el resto de las categorías funcionales incluyen aproximadamente el mismo porcentaje de genes reportados en el trabajo previo (Colebatch, *et al.*, 2004).

Además del análisis de transcritos a gran escala mediante arreglos de cDNA, también se han empleado herramientas bioinformáticas que aprovechan la gran cantidad de EST (etiquetas de secuencias expresadas) de *M. truncatula* y *L. japonicus* depositadas en bases de datos. Fedorova,

et al. (2002), realizaron el primer análisis de expresión *in silico* para identificar genes participantes en la simbiosis. A partir de 30 genotecas de cDNA provenientes de distintos órganos y estados vegetativos de *M. truncatula*, se seleccionaron cinco genotecas de nódulos de diferentes estados de desarrollo que contenían 20,347 EST representando 340 transcritos únicos o secuencias consenso (TC). Estos TC fueron analizados mediante BLASTX para buscar secuencias similares en la base de proteínas del GenBank. Como resultado, los TC fueron agrupados en tres categorías: 10 TC como secuencias nuevas; 193 TC como secuencias poco similares a secuencias conocidas ($E > 10^{-8}$) y 137 TC como secuencias muy similares a secuencias conocidas ($E < 10^{-8}$). Los TC identificados como secuencias nuevas no fueron similares a secuencias de proteínas, pero si fueron similares a secuencias de EST provenientes de genotecas de nódulos de *M. truncatula* y *M. sativa*. La mayoría (59%) de los TC que fueron poco similares a secuencias conocidas, codifican proteínas CCP que tienen en la porción N-terminal una secuencia señal secretora y en la porción C-terminal, varias cisteínas conservadas. Los 137 TC que mostraron gran similitud con secuencias de proteínas depositadas en el GenBank fueron agrupados en nueve categorías según su posible función: 19%, proteínas hipotéticas; 19%, transducción de señal; 17%, nodulinas; 11%, mantenimiento y estructura celular; 9%, no clasificadas (función desconocida); 9% metabolismo; 7%, transporte; 7%, leghemoglobinas; 2%, regulación hormonal y factores de crecimiento. Para verificar si genes identificados *in silico* como nódulo-específicos mostraban un aumento de expresión *in vivo* se evaluó la abundancia de transcritos para algunos TC por medio de macroarreglos, confirmando que efectivamente el análisis *in silico* era válido siempre y cuando los TC analizados estuvieran compuestos por cinco o más EST.

En otro estudio a mayor escala, se construyó un arreglo de cDNA consistente de 18,144 EST provenientes de diferentes genotecas de cDNA de *L. japonicus*: plantas de dos semanas de edad, raíces no infectadas, vainas en desarrollo, raíces noduladas de la mutante hipernodulante *har1* 4 dpi (días postinoculación) y nódulos maduros (23 dpi). Para hibridar con el arreglo se empleó RNA proveniente de raíces a 2, 4, 7 y 12 dpi, ya que esos tiempos representan el estado de infección abundante, el inicio del primordio de nódulo, el desarrollo del nódulo y los nódulos maduros, respectivamente. Encontraron que la expresión de 277 genes disminuyó considerablemente y que la expresión de 1076 genes resultó inducida durante la nodulación.

Estos últimos fueron clasificados en cinco grupos según la etapa de la nodulación: grupo 1 (infección), grupo 2 (inicio del primordio nodular), grupos 3 y 4 (desarrollo del nódulo), grupo 5 (nódulos completamente desarrollados, fijadores de N₂). Los grupos 1 y 2 constan de genes cuya expresión aumenta transitoriamente, pertenecen principalmente a las categorías de defensa, muerte celular y envejecimiento. En los grupos 3 y 4 se encontraron genes involucrados en crecimiento y división celular, síntesis de DNA y componentes de pared celular (o que participan en su síntesis). Al grupo 5 pertenecen genes que codifican para enzimas participantes en la asimilación del N₂ fijado y en el catabolismo de fotosintatos. Se encontró una gran cantidad de genes que se expresan a lo largo de todo el proceso de nodulación y que corresponden principalmente a las categorías de metabolismo primario y secundario (Kouchi, *et al.*, 2004).

En *M. truncatula* también fue realizado un extenso estudio del perfil de expresión génica donde se identificó un gran número de genes regulados diferencialmente durante distintos estados de la nodulación y en distintos fondos genéticos. Se construyeron arreglos basándose en 6000 cDNA provenientes de tres genotecas: nódulos jóvenes, micorrizas y raíces no inoculadas. Como blanco para hibridar con los arreglos, se obtuvo RNA (transcrito a cDNA) a partir de 10 condiciones: nódulos jóvenes (4 dpi) y maduros (10 dpi) de plantas tipo silvestre inoculadas con *S. meliloti*, nódulos jóvenes (4 dpi) y maduros (10 dpi) de plantas tipo silvestre inoculadas con la cepa mutante *S. meliloti nodA* (esta cepa no sintetiza correctamente FN), sistemas radicales completos (3 y 6 dpi) de la planta mutante supernodulante TR122 inoculada con *S. meliloti*, sistemas radicales completos (3 y 6 dpi) de la planta mutante supernodulante TR122 inoculada con la cepa mutante *S. meliloti nodA*, sistemas radicales completos (3 dpi) de la planta mutante *nfp* (no percibe a los FN) inoculada con *S. meliloti* y sistemas radicales completos (3 dpi) de la planta mutante *hcl* (percibe a los FN, pero está bloqueada justo antes del curvamiento del pelo radical) inoculada con *S. meliloti*. La expresión de 756 genes resultó estar regulada por los FN, ya que se indujo la expresión de 313 genes y se reprimió la expresión de 443 genes, en una o más condiciones al comparar los niveles de expresión entre la muestra inoculada y la no inoculada correspondiente. Los genes fueron agrupados en 16 categorías funcionales y 79 genes podrían estar involucrados en mecanismos de regulación ya que entre ellos se encuentran codificadas proteínas-G, remorina, anexina, cinasas, receptores tipo cinasa, factores de transcripción, proteínas de unión a calcio, etc. (El Yahyaoui, *et al.*, 2004).

En el único trabajo que hasta la fecha incluye perfiles de transcripción en eventos muy iniciales de la simbiosis, se analizó un microarreglo de cDNA de más de 6000 clonas obtenidas de distintos bancos de *M. truncatula* considerando varios tiempos de expresión: 1, 6, 12, 24, 48 y 72 horas postinoculación (hpi). Con base en los cambios observados en los perfiles de transcripción de los genes vegetales inducidos por la presencia de la bacteria, los eventos tempranos de la simbiosis fueron clasificados en cuatro estados principales (clasificación definida considerando también los cambios morfológicos que manifiestan los pelos radicales durante 72 hpi) y se identificaron posibles genes marcadores para cada uno de esos estados. En el estado I (1 hpi, cuando el ápice del pelo radical se hincha) se encontraron 26 genes como posibles marcadores y se encontró inducción de la expresión de genes relacionados con la unión y almacén de Ca^{2+} , pared celular, defensa y enfermedad, así como estrés. En el estado II (6 hpi, reinicio del crecimiento polar del pelo y 12 hpi, ramificación del pelo radical) encontraron 13 genes marcadores e inducción de la expresión de genes codificantes de peroxidasas o proteínas relacionadas con la estructura del citoesqueleto. En el estado III (24 hpi, curvamiento del pelo radical e inicio de la división celular y 48 hpi, inicio del primordio nodular y formación del hilo de infección) se presentaron 7 genes marcadores e inducción de la expresión de genes involucrados en traducción, transcripción, ciclo celular, organización del cromosoma y biosíntesis de flavonoides. El estado IV (72 hpi, primordio nodular e inicio de la infección) incluye 4 genes marcadores y se caracterizó por contener genes involucrados en la estructura del citoesqueleto, traducción, organización cromosómica y biosíntesis de flavonoides (Lohar, *et al.*, 2006).

Recientemente fue publicado un trabajo de Meschini *et al.* (2008) donde los autores hacen un análisis de transcritos mediante hibridación sustractiva para identificar genes en dos variedades de *P. vulgaris* (una variedad mesoamericana y otra andina) involucrados en el reconocimiento preferencial hacia una de dos cepas de *R. etli* (una cepa que porta un *nodC* tipo α y otra cepa con *nodC* tipo δ). Se utilizó cDNA proveniente de RNA de pelos radicales 24 hpi, las clonas obtenidas después de la sustracción fueron secuenciadas, obteniendo 218 secuencias en 41 TC (secuencias consenso tentativas). Comparando mediante BLASTX los TC con secuencias depositadas en el GenBank se pudieron clasificar 39 TC en categorías funcionales, donde 34 TC presentaron similitud con proteínas con función asignada y 5 TC codifican para posibles

proteínas con función desconocida. Las secuencias obtenidas fueron clasificadas así: 20%, síntesis y procesamiento de proteínas; 15%, metabolismo primario; 12%, transducción de señales; 12%, desconocidas; 10%, transporte; 7%, regulación del estado redox y estrés; 7%, metabolismo secundario y de hormonas; 5%, expresión genética y metabolismo de RNA; 5%, misceláneas y 5% no hit (Meschini, *et al.*, 2008).

2.3.-Estudios realizados en nuestro laboratorio sobre los eventos tempranos de la simbiosis en *Phaseolus vulgaris*.

Con el objetivo de estudiar los eventos tempranos en la interacción *P. vulgaris*-*R. etli*, en el laboratorio se están utilizando varias estrategias:

Utilización de fluoróforos en pelos radicales vivos, para medir distintas respuestas a los FN a nivel celular. Así se ha visto que, el influjo de Ca^{2+} intracelular en el ápice de los pelos aumenta inmediatamente después de la percepción de los FN y que luego de 10 min de exposición a los FN hay oscilaciones de la concentración de Ca^{2+} en la región perinuclear, esto es importante porque se sabe que este ion actúa como segundo mensajero en procesos de transducción de señales. Recientemente se encontró que 2 min después del tratamiento con los FN, hay un aumento rápido y transitorio de especies reactivas del oxígeno (Cárdenas, *et al.*, 2008). Se examinó también como los FN luego de 5 min, inducen rearrreglos del citoesqueleto de actina en los pelos radicales (Cárdenas, *et al.*, 1998, 1999, 2002).

También se ha trabajado en la caracterización celular y molecular de algunas líneas mutantes, entre ellas la línea mutante NN-DOR364 de *P. vulgaris* incapaz de formar nódulos, con el propósito de estudiar los eventos tempranos en esta relación simbiótica (Davis, *et al.*, 1988 y Pedalino, *et al.*, 1992). Hasta el momento se ha encontrado que en presencia de FN purificados o en presencia de *R. etli*, los pelos radicales en la línea mutante presentan hinchazón, deformación y bifurcación como sucede en las plantas de tipo silvestre, lo que significa que no está afectada en la percepción de los FN. Esta línea mutante no presenta respuestas como enroscamiento del pelo radical, división de células corticales, expresión de las nodulinas ENOD40 y ENOD2, expresión de leghemoglobina, formación del hilo de infección, ni formación de primordios

nodulares. Cuando los pelos radicales de la línea mutante son tratados con pentámeros de quitina como control, no presentan cambios morfológicos y el crecimiento del pelo se lleva a cabo de manera normal. En relación con los cambios en la concentración de Ca^{2+} presentes en el ápice de los pelos radicales como respuesta más temprana a los FN, la línea mutante presentó aumento en el influjo de este ion luego de 5 min de exposición a los FN y oscilaciones de Ca^{2+} en la región nuclear luego de 10 min, tal como sucede con las plantas de tipo silvestre (Cárdenas, *et al.*, 2006). Se ha reportado que el fenotipo de la línea mutante NN-DOR364 de *P. vulgaris* se debe a una mutación monogénica recesiva (Pedalino, *et al.*, 1992; Park y Buttery, 1994) pero aún queda por dilucidar en qué gene está la mutación.

En el presente trabajo se propone la identificación de genes que podrían estar participando en los eventos tempranos de la nodulación entre *P. vulgaris* y *R. etli*; esto mediante la expresión diferencial de genes en raíces de frijol como respuesta a los FN. Para ello se utilizó la técnica de hibridación sustractiva acompañada por PCR de supresión (SSH), con la que se pueden identificar genes regulados diferencialmente; es decir, aquellos genes cuya expresión aumenta o disminuye, en una condición particular, en un tejido específico y/o en un tiempo determinado (Diatchenko, *et al.*, 1996). Esta técnica ha sido empleada exitosamente en *P. vulgaris* para dilucidar qué genes son responsables en el reconocimiento cepa-específico de rizobios (Meschini, *et al.*, 2008) y en otras plantas para identificar genes expresados diferencialmente en distintos tejidos/órganos y en situaciones de estrés como congelamiento, sequía, infecciones, radiación, etc. Particularmente, la SSH puede resultar muy útil para detectar la expresión de genes con bajo nivel de transcripción (Sävestrand, *et al.*, 2002; Sánchez-Ballesta, *et al.*, 2003; Gibly, *et al.*, 2004).

3.-HIPÓTESIS

Si se compara el patrón de expresión génica en raíces de *Phaseolus vulgaris* expuestas a FN contra la expresión génica en raíces sin tratar, podrían ser identificados genes involucrados en los eventos tempranos del proceso simbiótico.

4.-OBJETIVOS

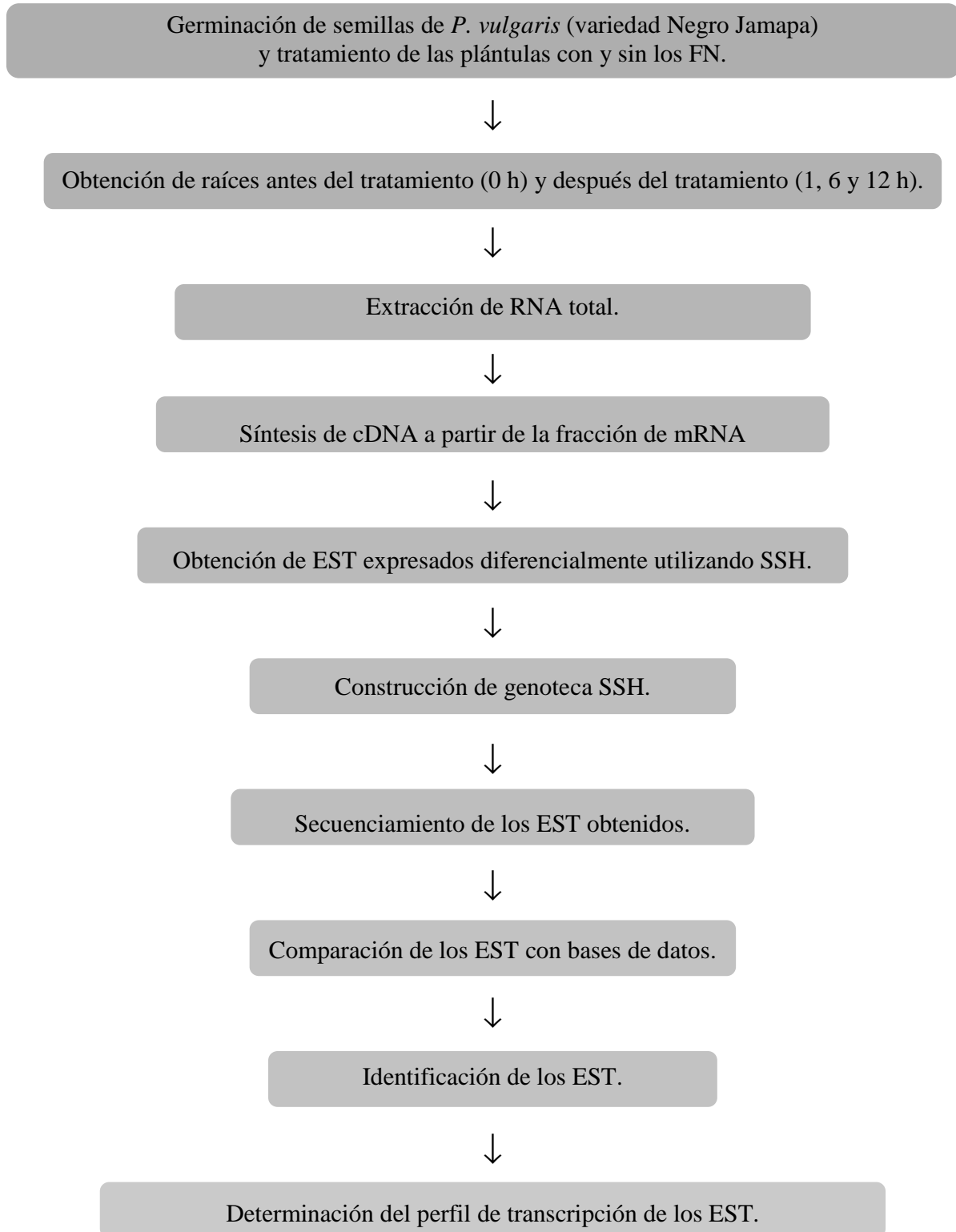
Objetivo general.

Identificar y caracterizar genes involucrados en los eventos tempranos de la interacción *Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli*.

Objetivos específicos.

- Obtener genes expresados diferencialmente en raíces de *Phaseolus vulgaris* después de 1, 6 y 12 h del tratamiento con los FN.
- Comparar la secuencia de esos genes con bases de datos ya existentes para otras leguminosas e idealmente identificar genes aún no reportados.

5.-ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6.-MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.-Germinación de semillas.

Semillas de *P. vulgaris* variedad Negro Jamapa fueron puestas a germinar. Se eligieron las semillas más grandes y firmes, las cuales debían estar completas, lisas y sin fisuras. Para esterilizarlas fueron lavadas con agua, sumergidas durante 1 min en etanol al 96%, enjuagadas con agua destilada estéril, lavadas durante 5 min con hipoclorito de sodio al 20% y nuevamente enjuagadas con agua destilada estéril. Las semillas, con ayuda de pinzas, se colocaron sobre una cama de papel absorbente humedecido con medio Fåhraeus pH 5.5 (Fåhraeus, *et al.*, 1957) y puesta sobre una charola de aluminio previamente esterilizada por autoclave. La charola con las semillas se cubrió con papel aluminio e incubó a 28 °C por 48 h (Cárdenas, *et al.*, 1995).

Medio Fåhraeus: CaCl₂ 0.68 mM, MgSO₄·H₂O 0.48 mM, KH₂PO₄ 0.73 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 0.001 mM, FeC₆H₅O₇ 0.02 mM, trazas Gibson (H₃BO₃ 46 mM, MnSO₄·4H₂O 12 mM, ZnSO₄·7H₂O 0.76 mM, CuSO₄·5H₂O 0.32 mM, Na₂MoO₄·2H₂O 0.33 mM).

6.2.-Tratamiento con FN.

Una vez que las semillas germinaron, fueron transferidas a un contenedor de vidrio e incubadas a 28 °C durante 24 h (con períodos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad), de manera que la raíz estuviera sumergida en medio Fåhraeus pH 5.5. Al término de este período las plantas estuvieron listas para aplicarles el tratamiento. Los FN de *R. etli* se adicionaron al medio, a una concentración final de 10⁻⁸ M, resuspendidos en chaps ([3-{3-colamidopropil}-dimetilamonio]-1-propano-sulfonato, es un detergente orgánico no desnaturalizante) diluído a 0.01%. Los FN fueron purificados en el laboratorio como indican Cárdenas, *et al.* (1995).

6.3.-Colecta de raíces.

Las raíces fueron colectadas antes de adicionar los FN (0 h) y luego de su adición (1, 6 y 12 h) cortándolas del resto de la planta y sumergiéndolas inmediatamente en nitrógeno líquido,

teniendo así cuatro muestras que se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de extraer el RNA total.

6.4.-Extracción de RNA total.

Las raíces colectadas fueron molidas en un mortero con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo muy fino (cada una de las cuatro muestras por separado). Por cada 100 mg de raíz pulverizada se añadió 1 ml de Trizol (Invitrogen, USA) y se continuó moliendo en el mortero hasta homogenizar. Se transfirió 1 ml de cada muestra a un tubo eppendorf y se adicionaron 0.2 ml de cloroformo/isoamílico (24:1) mezclando con ayuda de un vórtex. Se centrifugó a máxima velocidad (13,000 rpm) durante 5 min y la fase superior fue recuperada en un nuevo tubo; a esta fase se adicionaron 0.5 ml de alcohol isopropílico mezclando por inversión, centrifugando después durante 10 min. El sobrenadante fue desechado y al resto se agregó 0.5 ml de etanol al 70%; se centrifugó durante 2 min, nuevamente se desechó el sobrenadante y a la pastilla se adicionaron 10 μl de agua libre de RNAsa (H_2O tratada con DEPC 0.1%) (Chomczynski, *et al.*, 1987).

Para verificar la integridad del RNA durante el proceso de extracción, se tomó una alícuota (con volumen igual de bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se corrió en un gel desnaturizante de agarosa al 1% (0.15 g de agarosa se disolvieron en 15 ml de H_2O con 1.5 ml de MOPS 0.4 M pH 7 y se adicionaron 0.45 ml de formaldehído) (Sambrook, *et al.*, 1989).

Una vez verificada la integridad del RNA y habiéndolo cuantificado, las muestras de RNA extraído de raíces tratadas con FN se mezclaron en igual proporción, para tener una sola muestra problema. Entonces, el RNA extraído de raíces sin tratamiento es la muestra control; mientras que la mezcla de los RNA extraídos 1, 6 y 12 h después del tratamiento con los FN, constituyen una única muestra problema.

6.5.-Síntesis de cDNA.

Utilizando el *Super SMART PCR cDNA synthesis kit* (Clontech, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante, se sintetizaron los cDNA control y problema correspondientes. Con

este método, 4 µg de RNA total control y 4 µg de RNA total problema fueron transcritos a una primera hebra de cDNA, utilizando un oligonucleótido (dT) modificado que se une a la cola poli-A de los mRNA presentes en la muestra de RNA total. Después, los cDNA fueron purificados por cromatografía en columna para eliminar los nucleótidos no incorporados y fragmentos pequeños de cDNA (<0.1 Kb). Los cDNA purificados fueron amplificados por PCR en varios rangos de ciclos (15, 18, 21, 24, 27 y 30 ciclos) para determinar su concentración óptima. Este cDNA fue purificado nuevamente y digerido con la enzima *RsaI*, continuando con el protocolo para la SSH. Para confirmar que se enriqueció la cantidad de cDNA luego de ambas purificaciones, una alícuota de cada muestra fue sujeta a electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Mediante el *Super SMART PCR cDNA synthesis kit* se puede obtener 1-2 µg de cDNA a partir de 1 µg de RNA total (para llevar a cabo la SSH se necesita 1 µg de cDNA por muestra).

6.6.-Obtención de los EST por la técnica de SSH.

La hibridación sustractiva acompañada por PCR de supresión (SSH) (Diatchenko, *et al.*, 1996) se realizó según las instrucciones del *kit* comercial *Clontech PCR-Select cDNA subtraction* (Clontech, USA). Como cDNA control, se utilizó el sintetizado a partir del RNA extraído de raíces no tratadas con los FN. Como cDNA problema, se utilizó el sintetizado a partir de la mezcla de los RNA extraídos de raíces tratadas con los FN durante los tres distintos tiempos.

Mediante la técnica de SSH se pueden comparar dos poblaciones de mRNA y obtener clones de genes que están más representados en una población que en la otra. Inicialmente, ambas poblaciones de mRNA son convertidas a cDNA, teniendo entonces al cDNA problema que contiene transcritos diferencialmente expresados en la condición con tratamiento (en este caso, exposición de las raíces a FN durante distintos tiempos) y al cDNA control (en este caso, raíces sin tratamiento). Ambos tipos de cDNA son hibridados y las secuencias híbridas son removidas. Las secuencias restantes que no hibridan son las que representan genes expresados sólo en el cDNA problema y que están ausentes del mRNA control, estas secuencias pueden tener alta o baja abundancia pero mediante esta técnica se puede normalizar la abundancia de la población de estos cDNA (fig. 5).

6.6.1.-Bases moleculares de la SSH.

I.-Síntesis de cDNA y digestión con *RsaI*. A partir de RNA extraído del tejido, se sintetiza cDNA de doble cadena bajo las dos condiciones a comparar, problema y control. Una vez sintetizados ambos tipos de cDNA, se digieren por separado con *RsaI* para generar fragmentos cortos con extremos romos.

II.-Ligamiento de secuencias adaptadoras. El cDNA problema se divide en dos poblaciones (muestra 1 y muestra 2), cada población es ligada con una secuencia adaptadora diferente. Los extremos de los adaptadores no tienen grupos fosfato de manera que sólo se unen a los extremos 5' del cDNA. Los dos adaptadores aunque distintos, tienen un fragmento de secuencia idéntica que permite el pegado del *primer* 1 para PCR. Al cDNA control no se ligan adaptadores. A continuación se llevan a cabo dos hibridaciones.

III.-Primera hibridación. En la primera hibridación se mezcla un exceso de cDNA control con una pequeña muestra de cada población de cDNA problema, se desnaturalizan por calor y se permite que hibriden para generar distintos tipos de moléculas (*a, b, c* y *d* en fig. 5) en cada población. Durante esta primera hibridación, la fracción de moléculas de hebra sencilla del cDNA problema (moléculas tipo *a*) es normalizada, ya que podrían encontrarse en baja o alta concentración, estas moléculas son las que están enriquecidas significativamente con secuencias expresadas diferencialmente. La normalización ocurre porque la generación de moléculas homohíbridas (moléculas tipo *b*) y heterohíbridas (moléculas tipo *c*) es más rápida al suceder entre moléculas más abundantes; la hibridación de los cDNA menos abundantes es más lenta y permanecen como moléculas de hebra sencilla. Controlando la duración de la hibridación, las formas de hebra sencilla de los cDNA altamente abundantes pueden ser reducidos a los mismos niveles de las moléculas menos abundantes, normalizando entonces la representación de la población de cDNA. Los cDNA comunes a las dos poblaciones forman en su mayoría heterohíbridos (moléculas tipo *c*) con el cDNA control debido a que este se encuentra en exceso.

IV.-Segunda hibridación. Las dos poblaciones de la primera hibridación son combinadas, se adiciona una nueva porción de cDNA control desnaturalizado y se aumenta la extensión de la

hibridación. Bajo estas condiciones, sólo los cDNA problema de hebra sencilla pueden reasociarse y formar moléculas tipo *b*, *c* y nuevas moléculas híbridas tipo *e* (con adaptadores distintos en cada extremo) que en su mayoría consisten en secuencias expresadas diferencialmente.

V.-Primera amplificación por PCR. La población total de moléculas es sujeta a dos rondas de PCR para amplificar mayoritariamente las secuencias expresadas diferencialmente. Antes de la primera amplificación por PCR, las hebras con adaptadores son extendidas creando el sitio de unión al *primer 1* para PCR, que en esta ronda es complementario a ambos adaptadores. En esta primera amplificación por PCR, están presentes varios tipos de moléculas híbridas (*b*, *c*, *d* y *e*) que contienen distintas combinaciones de secuencias adaptadoras en sus extremos, pero sólo los ds cDNA con diferentes adaptadores en cada extremo son amplificados exponencialmente.

VI.-Segunda amplificación por PCR. En la segunda amplificación se reduce la presencia de moléculas no deseadas y se enriquece el número de secuencias expresadas diferencialmente. De las moléculas presentes en esta segunda amplificación por PCR, las moléculas tipo *a* y *d* no pueden ser amplificadas nuevamente porque no contienen sitios de unión al *primer nested 1* para PCR o al *primer nested 2R* para PCR. Las moléculas tipo *c* sólo pueden ser amplificadas en proporción lineal. Las moléculas tipo *b* contienen largas secuencias invertidas repetidas en sus extremos y forman estructuras tipo lazo muy estables que después de cada desnaturalización y alineamiento ya no pueden ser amplificadas debido al efecto de supresión (efecto que también sucede con estas moléculas durante la primera amplificación por PCR). Sólo las moléculas tipo *e* tienen distintas secuencias adaptadoras en sus extremos, una proviene de la muestra 1 y la otra proviene de la muestra 2, de modo que pueden ser amplificadas exponencialmente por PCR y generar una población preferencialmente enriquecida para genes que se expresan diferencialmente en una condición o tratamiento en particular.

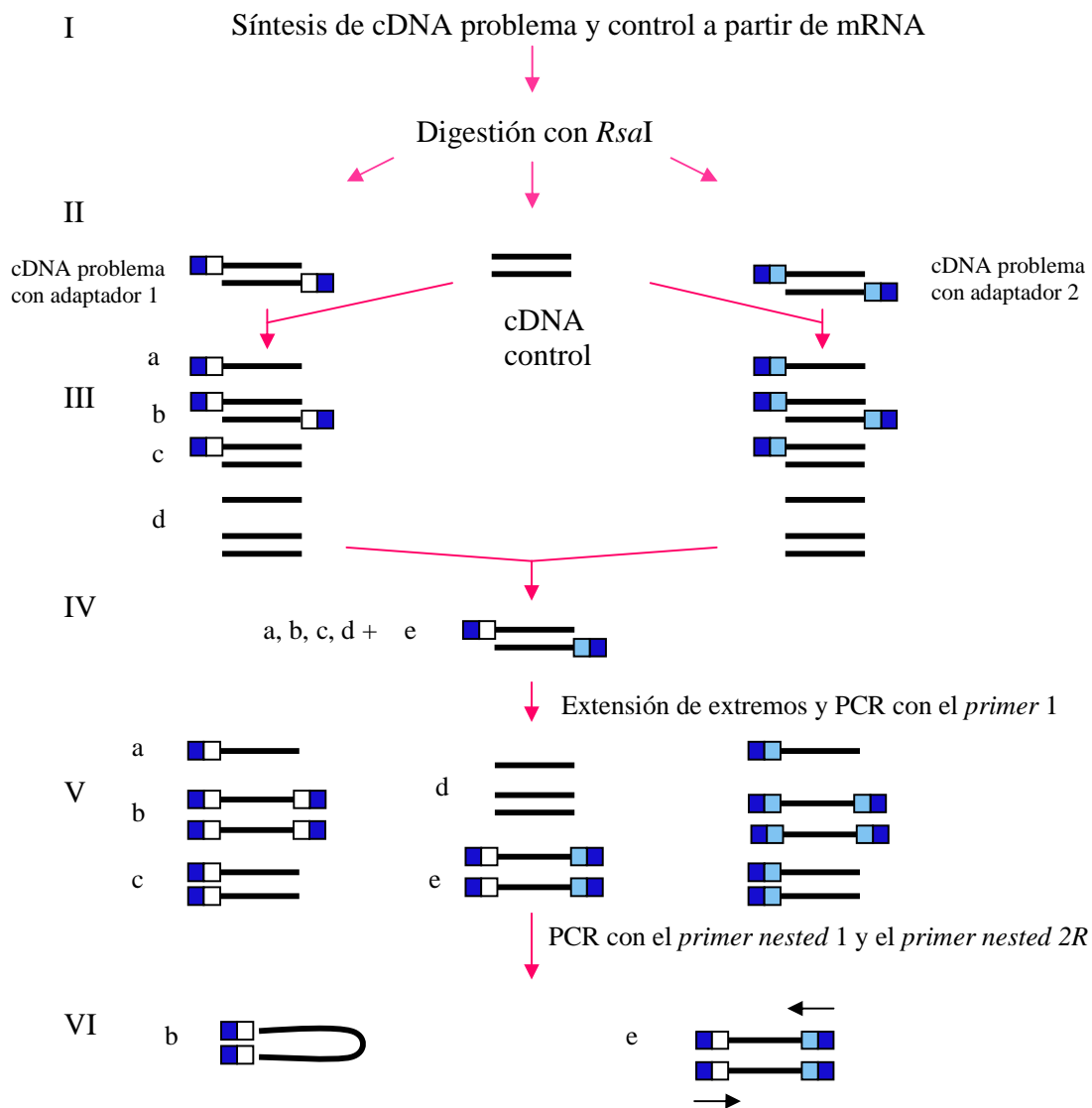


Fig. 5.- Esquema general para la SSH. I, síntesis de cDNA y digestión con *RsaI*; II, ligamiento de secuencias adaptadoras; III, primera hibridación; IV, segunda hibridación; V, primera amplificación por PCR; VI, segunda amplificación por PCR. *a,b,c,d* y *e* son el tipo de moléculas resultantes en cada paso de la SSH. En azul oscuro se representa el sitio de unión al *primer 1* para PCR; en blanco se representa el sitio de unión al *primer nested 1* para PCR y en azul claro se representa el sitio de unión al *primer nested 2R* para PCR.

6.7.-Construcción de la genoteca SSH.

Los cDNA (ahora EST) obtenidos en la amplificación secundaria por PCR y que fueron sustraídos a partir de la condición de tratamiento con los FN, fueron insertados directamente en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, USA) y con este se transformaron células quimiocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células fueron cultivadas en medio LB con 50 µg/ml de kanamicina. Ver en el apéndice el mapa del vector.

Medio LB (Luria-Bertani): triptona 1.0%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0%, agar 1.5%, se ajustó el pH a 7.0 y el medio fue esterilizado en autoclave. Al momento de usar se adicionó kanamicina 50 µg/ml (Sambrook, *et al.*, 1989).

6.8.-Purificación de DNA plasmídico.

Las clonas obtenidas fueron cultivadas en 10 ml de medio LB (con 50 µg/ml de kanamicina) durante 16 h a 37 °C y con agitación de 200 rpm; después las células fueron concentradas por centrifugación y se purificó el DNA con ayuda del kit *Wizard plus minipreps DNA purification system* (Promega, USA).

6.9.-Análisis de restricción.

El DNA purificado de las clonas obtenidas fue digerido con la enzima *EcoRI* para verificar que efectivamente hubiera un inserto en el vector. Los insertos liberados fueron visualizados en gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio.

Mezcla de restricción: 1 µg de DNA (fragmento de restricción), 1 µl *EcoRI* (10 U/µl), 3 µl buffer H y H₂O para un volumen final de 30 µl.

6.10.-PCR en colonia.

Alternativamente al análisis de restricción, se realizó un PCR en colonia de las clonas obtenidas para verificar la presencia de inserto, utilizando los *primers* M13 *forward* y M13 *reverse* (ver apéndice). Las condiciones para el PCR fueron: 1 ciclo a 94 °C-10 min; 40 ciclos a 94 °C-30 s, 50 °C-30 s, 72 °C-1 min 30 s; 1 ciclo final de extensión a 72 °C-7 min. Los insertos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio.

6.11.-Secuenciamiento de los EST.

Plásmidos purificados de las clonas de interés fueron resuspendidos en H₂O (volumen final de 16 µl) a una concentración de 500-750 ng de DNA, se adicionaron 10 pmol/µl de los oligonucleótidos universales M13 *forward* y M13 *reverse* y los insertos fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 3700 (unidad de secuencia, IBT, UNAM). Ver secuencias en el apéndice.

6.12.-Análisis de los EST.

Los EST secuenciados se compararon con secuencias de proteínas depositadas en el NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando la herramienta BLASTX. Para cada EST se consideró como el mejor alineamiento aquel que tuviera un valor $E < e^{-4}$, eligiendo como el mejor valor, el más cercano a cero. A los EST identificados se les asignaron términos GO para clasificarlos en categorías funcionales, usando la herramienta AmiGO del sitio <http://www.geneontology.org/> que utiliza tres niveles de clasificación: función molecular, proceso biológico y componente celular. Los EST que no tuvieron homología con alguna secuencia proteica, fueron comparados de nuevo con la base de datos del NCBI, que contiene secuencias de nucleótidos traducidos en los seis marcos posibles de lectura, usando la herramienta TBLASTX o con la base de datos para *P. vulgaris* (PhvGI Gene Index) en el sitio del TIGR (The Institute for Genomic Research, <http://www.jcvi.org/>).

6.13.-Hibridación de DNA tipo dot-blot.

I.-Preparación de membranas. Plásmido purificado (1 µg/100 µl de TE) de cada una de las clonas obtenidas por SSH, fue transferido por absorción a membranas Hybond-N⁺ (Amersham, UK) con ayuda de un aparato de microfiltración (Bio-Dot SF, Bio-Rad, USA), de manera tal que cada muestra de plásmido quedó aplicada en forma de mancha circular sobre la membrana (se prepararon ocho membranas). Las membranas se dejaron secar al aire y después fueron desnaturalizadas en NaOH 0.6 M por 2 min, luego fueron neutralizadas con Tris-HCl 0.5 M (pH 7.5) por 2 min y finalmente se lavaron con agua destilada durante 30 s. Las muestras fueron inmovilizadas sobre las membranas irradiándolas con UV (UVC 500 Crosslinker, Hoefer, USA). Las membranas se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de usar. Como control interno positivo se utilizó producto de PCR de acuaporina (cuya expresión es constitutiva) y como controles negativos se utilizaron agua destilada y los *nested PCR primers* 1 y 2R del kit *Clontech PCR-Select cDNA subtraction*.

II.-Marcado de sondas. Como sondas se utilizaron los cDNA obtenidos a partir de los RNA totales extraídos de raíces de *P. vulgaris* (antes de tratar a las raíces con los FN y 1, 6 y 12 h después del tratamiento), teniendo entonces cuatro sondas distintas (una de cada condición). Cada sonda fue marcada por separado. 20 µg de cada cDNA fueron desnaturalizados en 38 µl de TE (10:1, Tris/HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) durante 7 min a 100 °C (en baño con agua) y enfriados después en hielo por 5 min. Se agregaron 50 µCi de [α -³²P]dCTP, para la incorporación de la marca radioactiva se utilizó el *kit* comercial *Rediprime II Random Prime Labelling System* (Amersham, UK), marcando la sonda durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez marcada la sonda, la reacción se detuvo con 5 µl de EDTA 0.2 M y la sonda se precipitó en 300 µl de RPE (DNA del esperma de salmón 0.1 mg/ml, EDTA 10 mM pH 8.0, CH₃COONH₄ 2.5 M pH 7.5) y 600 µl de isopropanol a -20 °C durante 24 h. Posteriormente, la sonda marcada fue centrifugada 30 min a 13,000 rpm. La pastilla se resuspendió en 200 µl de NaOH 0.1 N, quedando la sonda lista para hibridar.

III.-Hibridación de membranas. Antes de adicionar la sonda marcada, las membranas fueron puestas en tubos para hibridación (dos membranas en cada tubo, teniendo entonces 4 tubos, uno

para cada condición) humedeciéndolas con 5 ml de solución de fosfatos (Na_2HPO_4 300 mM pH 7.2, SDS 7%) y se incubaron a 65 °C por lo menos 2 h. Después se cambió la solución de fosfatos por una recién preparada y se adicionó la sonda marcada (200 μl) correspondiente a cada condición, dejando hibridar a 65 °C durante 16 h.

IV.-Lavado y exposición de membranas. Las membranas fueron lavadas con una solución de SSC 2X-SDS 0.1% durante 15 min a temperatura ambiente y luego enjuagadas con SSC 2X. Después se expusieron durante 72 h en una pantalla autoradiográfica (Phosphor Screen, Molecular Dynamics, UK), se escanearon mediante el sistema PhosphorImager (Molecular Dynamics, UK) y la imagen fue visualizada usando el programa ImageQuant 3.2 (Molecular Dynamics, UK).

V.-Análisis de la imagen autoradiográfica . Las imágenes autoradiográficas escaneadas y guardadas como archivos (*.tif) fueron analizadas con el programa ImageJ 1.33s (NIH, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para asignar valores numéricos a cada mancha sobre las membranas de acuerdo con su densidad en pixeles. Con este programa se calculó la densidad integrada de cada mancha, el valor resultante fue normalizado de acuerdo con el valor de la mancha correspondiente al control acuaporina. Como la transferencia de plásmido a membrana se realizó por duplicado para cada condición de tratamiento, los dos valores de densidad normalizada para un misma muestra fueron promediados (y calculada la desviación estándar) obteniendo así un único valor correspondiente (en unidades arbitrarias) al nivel de transcripción de cada EST. Ver en apéndice los datos correspondientes.

6.14.-Análisis estadístico del perfil de transcripción de los EST.

Por medio de la prueba estadística ANOVA de un factor, se determinó si había diferencia en el nivel de transcripción de cada EST en cada uno de los tratamientos. Considerando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se determinó que no hay cambios significativos en la expresión del EST en cada uno de los tratamientos si $p > 0.05$ y que sí hay cambios significativos en la expresión del EST en cada tratamiento si $p \leq 0.05$.

7.-RESULTADOS

7.1.-Obtención de los EST.

Un RNA total íntegro es crucial para la sustracción efectiva por SSH de genes expresados diferencialmente; por lo que la integridad de los RNA (extraídos en las distintas condiciones experimentales) fue verificada mediante electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa. En la fig. 6 se observa que la intensidad de las bandas 28S y 18S (correspondientes al rRNA) está en proporción 1.5-2.5:1, característica importante que indica que el RNA extraído en cada condición de tratamiento estaba en buen estado.

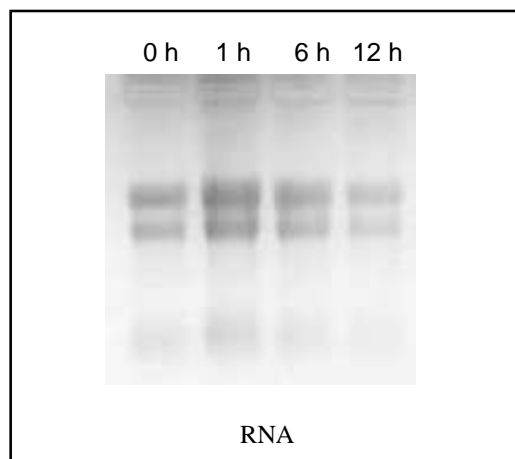


Fig. 6.-RNA total extraído de raíces de *P. vulgaris*. 0 h, RNA total control (raíces sin tratamiento); 1 h, 6 h y 12 h, RNA problema (tratamiento con los FN durante las horas respectivas). Gel de agarosa 1%/EtBr.

Una vez verificada la integridad de las cuatro muestras de RNA total, se usó el *Super SMART PCR cDNA synthesis kit* (Clontech, USA) para sintetizar los cDNA control y problema. A partir de 4 µg de RNA total control y 4 µg de RNA problema (la mezcla de los RNA obtenidos en los tres distintos tiempos), usando un oligonucleótido (dT) modificado que se une a la cola de poli-A en el extremo 3' de los mRNA, fue sintetizado el cDNA de cada muestra. Posteriormente las muestras de cDNA fueron amplificadas por PCR desde 15 hasta 30 ciclos, con el objeto de

determinar el número óptimo de ciclos en el que estuvieran representados homogéneamente fragmentos de cDNA de todos los tamaños y donde el cDNA se mantuviera en fase exponencial de amplificación. Se eligió el cDNA amplificado a 18 ciclos que contiene cDNA desde 400 pb hasta 1500 pb y que muestra concentración suficiente. A ciclos mayores se corre el riesgo de alcanzar pronto el umbral máximo de amplificación y empobrecer la producción de cDNA, un cDNA amplificado en exceso no es un templado apropiado para la SSH (fig.7).

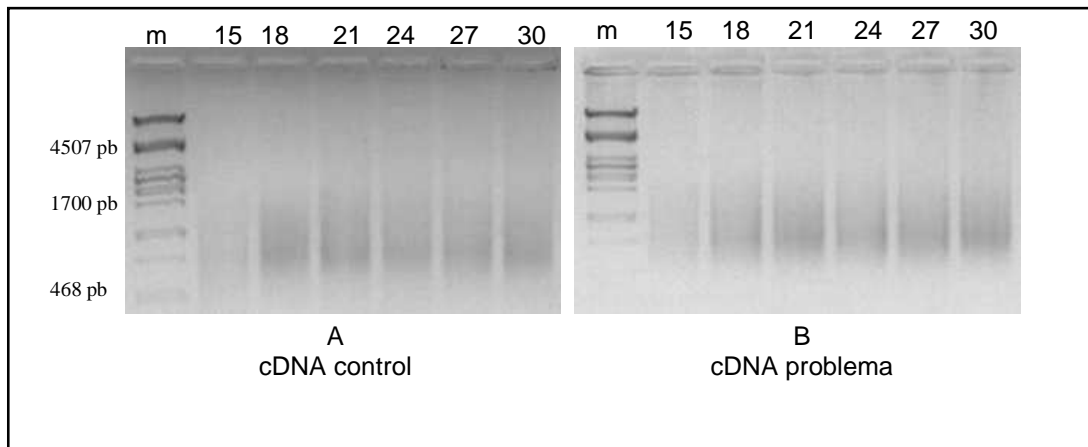


Fig. 7.-Amplificación de cDNA. A, amplificación por PCR del cDNA control (obtenido a partir de RNA extraído de raíces sin tratamiento); B, amplificación por PCR del cDNA problema (obtenido a partir de RNA total extraído de raíces tratadas con FN durante distintos tiempos). m, marcador de peso molecular (DNA de λ digerido con *Pst*I); 15, 18, 21, 24, 27 y 30 indican el número de ciclos de PCR. Gel de agarosa 1.2%/EtBr.

Los cDNA control y problema amplificados a 18 ciclos por PCR, fueron sujetos dos veces a cromatografía en columna para purificarlos. Luego de la segunda elución por columna, el cDNA se enriqueció en un 50% lo que indicó que los cDNA fueron purificados exitosamente (fig. 8).

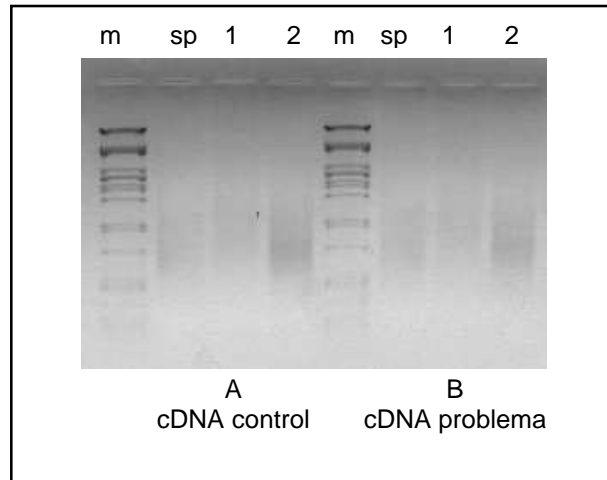


Fig. 8.-cDNA purificado por columna. A, cDNA control; B, cDNA problema. m, marcador de peso molecular (DNA de λ digerido con *Pst*I); sp, cDNA sin purificar; 1, cDNA purificado en una primera elución; 2, cDNA vuelto a purificar en una segunda elución. Gel de agarosa 1.2%/EtBr.

Los cDNA control y problema purificados fueron digeridos con la enzima *Rsa*I, que genera fragmentos de cDNA cortos con extremos romos necesarios para el ligamiento de secuencias adaptadoras y para la sustracción. Después de la digestión con *Rsa*I, los cDNA fueron purificados nuevamente y se pudo comprobar por electroforesis en gel que la distribución del tamaño de los cDNA se redujo (fig. 9).

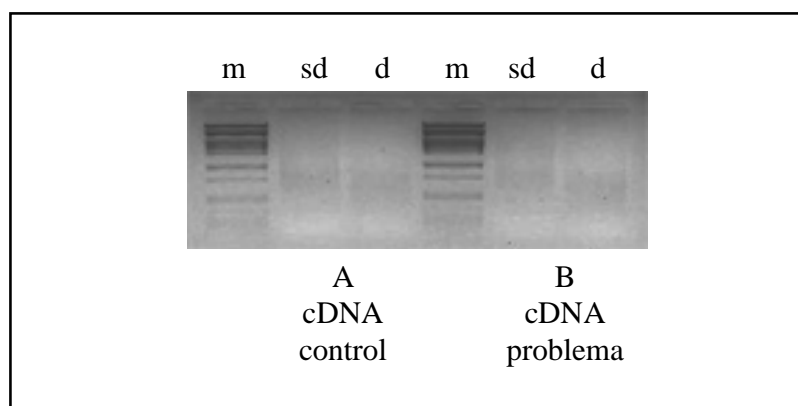


Fig. 9.-cDNA digeridos con *Rsa*I. A, cDNA control; B, cDNA problema. m, marcador de peso molecular (DNA de λ digerido con *Pst*I); sd, cDNA sin digerir; d, cDNA, digerido con *Rsa*I. Gel de agarosa 1.2%/EtBr.

Una vez que los cDNA control y de prueba fueron digeridos y purificados, el cDNA problema se dividió en dos poblaciones y a cada una de ellas les fueron ligadas secuencias adaptadoras distintas para poder llevar a cabo la hibridación sustractiva (una alícuota de estas poblaciones de cDNA fue reservada para usarla como control de la eficiencia de la sustracción; esta alícuota no fue sujeta a SSH, sólo a las dos rondas de PCR que siguen a la sustracción y representa al cDNA problema no sustraído). Ambas poblaciones de cDNA fueron sujetas a dos rondas de hibridación para enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente, normalizarlas y generar templates para su posterior amplificación en dos rondas de PCR. En la primera ronda de PCR sucede un efecto de supresión que impide a las secuencias no deseadas amplificar exponencialmente, mientras que las secuencias diferencialmente expresadas amplifican de forma exponencial. En la segunda ronda de PCR las secuencias de interés son enriquecidas y representan al cDNA problema sustraído (fig. 10).

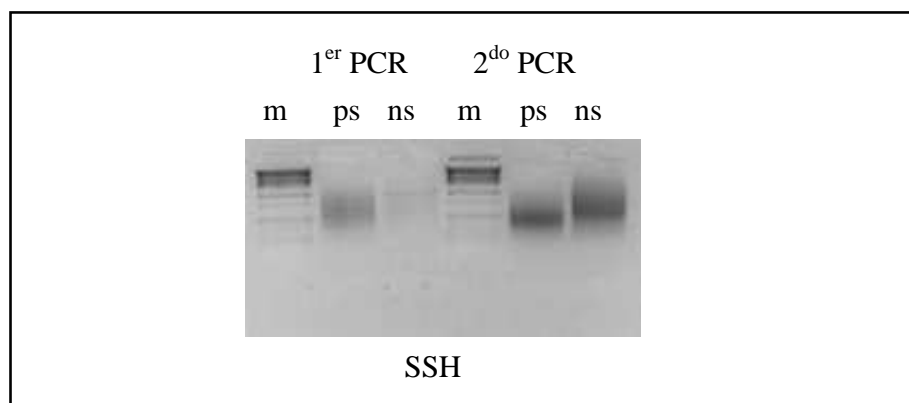


Fig. 10.-Amplificación y enriquecimiento de las secuencias expresadas diferencialmente. m, marcador de peso molecular; ps, cDNA problema sustraído (representa las secuencias expresadas diferencialmente en raíces tratadas con FN); ns, cDNA no sustraído. Se observa un enriquecimiento luego del 2^{do} PCR en la concentración del cDNA problema sustraído. Gel de agarosa 1.2%/EtBr.

7.2.-Identificación de los EST.

Los productos de PCR sustraídos por SSH (ahora EST) fueron clonados en el vector pCR 2.1-TOPO y con este se transformaron células de *E. coli* para obtener la genoteca SSH. A las más de 300 clonas obtenidas se les asignó la nomenclatura Pv-sshfwdtc-número de clona. Se verificó la

presencia de inserto mediante PCR en colonia usando los *primers* M13 *forward* y *reverse* (fig. 11) o bien digiriendo al plásmido con la enzima *EcoRI*, encontrando que menos del 25% de las clonas contenían inserto.

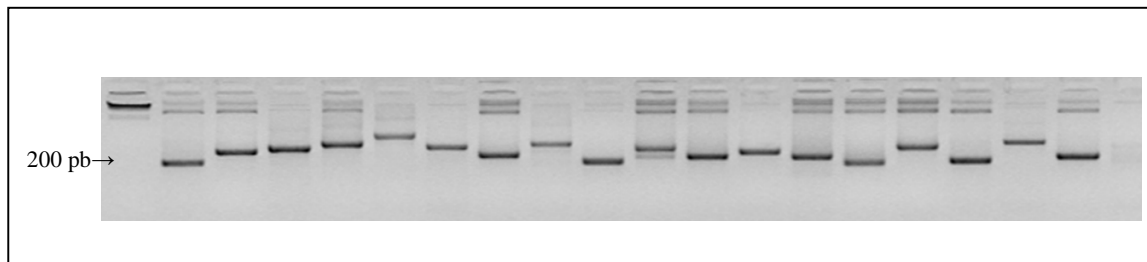


Fig. 11.-Presencia de insertos en clonas de la genoteca SSH. Se purificó plásmido de algunas clonas que integran la genoteca SSH y por PCR en colonia fueron amplificados los insertos. Gel de agarosa 1.5%/EtBr.

Se purificó DNA plasmídico de las clonas que contenían inserto para secuenciarlo utilizando los *primers* M13 *forward* y *reverse*. Se obtuvieron 56 EST diferentes de los cuales ocho son redundantes, ya que están representados más de una vez en la genoteca SSH. El rango de tamaño de los EST secuenciados fue desde 131 pb hasta 1128 pb, aunque la mayoría tuvo un tamaño de 200-400 pb (fig. 12).

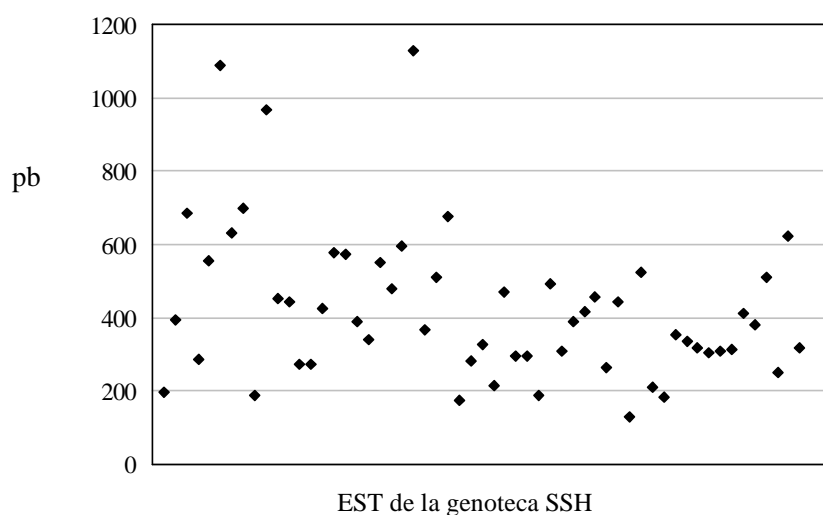


Fig.12.-Distribución del tamaño en pares de bases (pb) de los EST de la genoteca SSH.

Para determinar la identidad de los 56 EST, la secuencia correspondiente a cada uno fue comparada con las secuencias de proteínas depositadas en el NCBI mediante el programa BLASTX. Una vez conociendo la identidad de los EST, fueron clasificados en once categorías funcionales usando la herramienta AmiGO: metabolismo (11 EST, 19%), modificación de proteínas (9 EST, 16%), función desconocida (8 EST, 14%), función no determinada -EST que al ser comparados con la base de datos no tuvieron homología con alguna proteína pero si con otro EST- (7 EST, 13%), traducción (5 EST, 9%), transporte (4 EST, 7%), transcripción (4 EST, 7%), regulación del estado redox (3 EST, 5%), defensa (2 EST, 4%), respuesta a estímulos (2 EST, 4%) y desarrollo (1 EST, 2%) (fig. 13).

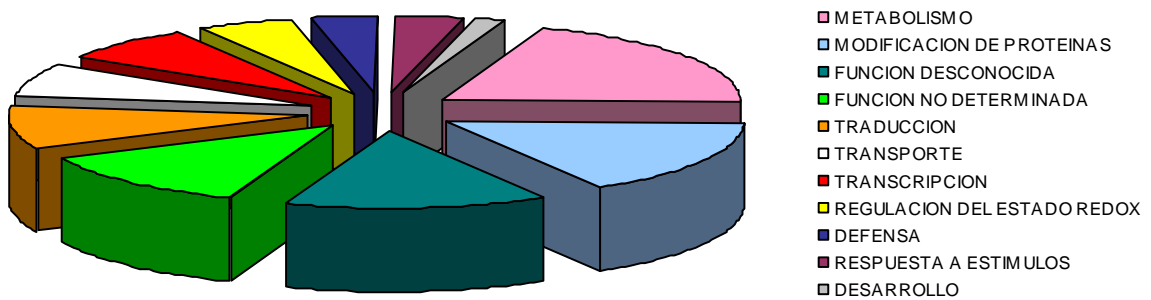


Fig.13.- Clasificación funcional de los EST de *P. vulgaris* expresados diferencialmente en respuesta a los FN de *R. etli*.

De los EST incluidos en la genoteca sustractiva, 41 EST (73%) resultaron ser similares a proteínas ya identificadas o a dominios proteicos conocidos. 8 EST (14%) fueron similares a proteínas desconocidas asignadas a un organismo. 7 EST (13%) no fueron similares a alguna secuencia proteica; sin embargo, al hacer un nuevo alineamiento con las secuencias traducidas depositadas en el NCBI o en el TIGR, se obtuvieron alineamientos significativos con EST de *P. vulgaris*, *G. max* y *M. truncatula* que aún no han sido identificados. Sólo el EST Pv-sshfwdtc-02 no alineó con alguna secuencia (tablas 2-12).

Tabla 2.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de metabolismo.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-13 (540 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU20666.1 (proteína de respuesta a estrés con dominio α/β de barril).	6e-05	1
Pv-sshfwdtc-21 (969 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU20294.1 (similar a la cadena α -3 de la tubulina).	1e-91	1
Pv-sshfwdtc-47 (342 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU23241.1 (adenililsulfato cinasa).	1e-23	1
Pv-sshfwdtc-51 (550 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU18522.1 (argininosuccinato sintasa).	6e-41	1
Pv-sshfwdtc-56 (480 pb)	Lipoxigenasa de <i>Phaseolus vulgaris.</i> CAA45086.1	3e-64	1
Pv-sshfwdtc-61 (510 pb)	Asparagina sintetasa tipo II de <i>Phaseolus vulgaris.</i> CAA08913.1	3e-56	1
Pv-sshfwdtc-63 (173 pb)	Asparagina sintetasa tipo III de <i>Phaseolus vulgaris.</i> CAO91866.1	3e-19	1
Pv-sshfwdtc-82 (216 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU20337.1 (xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa).	3e-18	1
Pv-sshfwdtc-84 (471 pb)	Proteína de <i>Medicago truncatula.</i> ABD28385.2 (proteína carboxilasa dependiente de biotina).	1e-18	1
Pv-sshfwdtc-99 (493 pb)	Proteína hipotética de <i>Populus trichocarpa.</i> EEE90621.1 (con dominio catalítico de unión a piridoxal fosfato, superfamilia aspartato aminotransferasa).	3e-43	1
Pv-sshfwdtc-211 (131 pb)	Proteína desconocida de <i>Arabidopsis thaliana.</i> AAM65668.1 (nucleótido ramnosa sintasa/epimerasa reductasa).	6e-11	2

Tabla 3.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de modificación de proteínas.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-14 (632 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU13218.1 (subunidad β tipo 6 del proteasoma 26S).	2e-46	1
Pv-sshfwdtc-17 (699 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU19272.1 (con un dominio similar a una doliquil difosfo oligosacárido glicosil transferasa).	8e-54	1
Pv-sshfwdtc-45 (389 pb)	Proteína de <i>Vitis vinifera.</i> CBI25473.1 (dominios parecidos a S/T cinasas).	2e-22	1
Pv-sshfwdtc-60 (369 pb)	Proteína de <i>Ricinus communis.</i> EEF39370.1 (familia de proteínas con dedos de zinc tipo DHHC).	1e-32	1
Pv-sshfwdtc-62 (674 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU13609.1 (con un dominio similar a la subunidad z de COPI).	8e-66	1
Pv-sshfwdtc-111 (265 pb)	Proteína de <i>Vitis vinifera.</i> CBI26348.1 (familia de prolil oligopeptidasas).	9e-31	1
Pv-sshfwdtc-217 (184 pb)	Proteína de <i>Vitis vinifera.</i> CBI37450.1 (con dominio catalítico S/T cinasa).	3e-27	2
Pv-sshfwdtc-229 (304 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU18431.1 (proteína fosfatasa tipo C2).	2e-18	1
Pv-sshfwdtc-240 (250 pb)	RPN1 de <i>Ricinus communis.</i> EEF44376.1 (subunidad componente del proteasoma 26S).	3e-40	2

Tabla 4.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de función desconocida.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-07 (286 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> AAA65012.1	4e-10	1
Pv-sshfwdtc-29 (442 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU21207.1	6e-43	1
Pv-sshfwdtc-38 (377 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU14912.1	7e-17	1
Pv-sshfwdtc-59 (1128 pb)	Proteína de desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU19335.1	2e-12	1
Pv-sshfwdtc-102 (307 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU13679.1	3e-14	1
Pv-sshfwdtc-106 (416 pb)	Proteína desconocida de <i>Ricinus communis.</i> EEF31210.1	1e-05	1
Pv-sshfwdtc-233 (314 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU16083.1	9e-20	1
Pv-sshfwdtc-246 (319 pb)	Proteína de <i>Ricinus communis.</i> EEF42538.1	1e-31	1

Tabla 5.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de función no determinada.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-02 (198 pb)	No alineó con alguna secuencia.	-	1
Pv-sshfwdtc-04 (393 pb)	EST de <i>Medicago truncatula.</i> CU302345.1	1e-14	2
Pv-sshfwdtc-08 (553 pb)	EST de <i>Phaseolus vulgaris.</i> EU196765.1	1e-85	1
Pv-sshfwdtc-32 (275 pb)	EST de <i>Glycine max.</i> BT098379.1	3e-05	1
Pv-sshfwdtc-75 (280 pb)	EST de <i>Glycine max.</i> TC289235	2e-15	2
Pv-sshfwdtc-219 (354 pb)	EST de <i>Phaseolus vulgaris.</i> TC10362	1e-67	1
Pv-sshfwdtc-224 (320 pb)	EST de <i>Phaseolus vulgaris.</i> TC13146	1e-61	1

Tabla 6.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de traducción.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-96 (295 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU13235.1 (factor eIF-5A).	2e-34	1
Pv-sshfwdtc-223 (337 pb)	Proteína Nop56 de <i>Arabidopsis thaliana.</i> AAF02835.1	7e-36	1
Pv-sshfwdtc-234 (410 pb)	Proteína hipotética de <i>Vitis vinifera.</i> CAN70753.1 (factor eIF-5).	6e-32	3
Pv-sshfwdtc-237 (382 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU13744.1 (proteína ribosomal S25).	6e-32	2
Pv-sshfwdtc-245 (623 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU14554.1 (proteína ribosomal L32).	2e-60	1

Tabla 7.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de transporte.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-19 (186 pb)	Transportador ABC de <i>Ricinus communis.</i> EEF28841.1	4e-10	1
Pv-sshfwdtc-105 (389 pb)	Hemoglobina no simbiótica de <i>Glycine max.</i> AAA97887.1	3e-52	1
Pv-sshfwdtc-208 (445 pb)	Proteína de <i>Phaseolus coccineus.</i> AAY82249.1 (canal mitocondrial selectivo de aniones dependiente de voltaje).	7e-25	1
Pv-sshfwdtc-212 (524 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU18447.1 (translocador de nucleótidos de adenina).	3e-78	2

Tabla 8.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de transcripción.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-05 (685 pb)	Proteína desconocida de <i>Picea sitchensis.</i> ABR16597.1 (subunidad α -2 del factor TFIIE).	4e-25	1
Pv-sshfwdtc-86 (297 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU16761.1 (familia de proteínas con dedos de zinc tipo C2H2).	1e-11	2
Pv-sshfwdtc-108 (458 pb)	Proteína hipotética de <i>Vitis vinifera.</i> CBI30939.1 (tipo RNA helicasa dependiente de ATP).	8e-35	1
Pv-sshfwdtc-238 (512 pb)	Proteína de <i>Phaseolus vulgaris.</i> AAQ09002.1 (familia RAMP4 asociada a ribosoma).	6e-31	1

Tabla 9.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de regulación del estado redox.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-22 (452 pb)	Proteína de <i>Glycine max.</i> DQ340234.1 (familia del citocromo P450).	2e-23	1
Pv-sshfwdtc-35 (274 pb)	β -amirina y soforadiol 2,4-hidroxilasa de <i>Glycine max.</i> BAE94181.1	2e-12	1
Pv-sshfwdtc-37 (425 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU22687.1 (proteína ALDH2C4).	1e-41	1

Tabla 10.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de defensa.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-43 (574 pb)	Proteína tipo PR1 de <i>Phaseolus vulgaris.</i> ABF13312.1	3e-46	1
Pv-sshfwdtc-67 (326 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU20128.1 (familia de fosfolipasas/carboxilesterasas tipo SOBER1).	8e-34	1

Tabla 11.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de respuesta a estímulos.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-98 (188 pb)	Proteína desconocida de <i>Vitis vinifera.</i> EF100453.1 (proteína pequeña de choque térmico 17.5).	1e-05	1
Pv-sshfwdtc-231 (307 pb)	Proteína de <i>Vitis vinifera.</i> CBI31700.1 (histona H4).	3e-19	1

Tabla 12.-Identidad de los EST clasificados en la categoría de desarrollo.

EST (tamaño en pb)	Mejor alineamiento con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas y su número de acceso	Valor E	Redundancia en la genoteca SSH
Pv-sshfwdtc-57 (594 pb)	Proteína desconocida de <i>Glycine max.</i> ACU16492.1 (dominios parecidos a la proteína Fb15).	2e-31	1

7.3.-Perfil de transcripción de los EST.

El perfil de transcripción de los EST fue analizado por medio de hibridaciones de DNA tipo dot-blot, donde 1 μ g de plásmido purificado de cada clona de la genoteca SSH fue fijado en membranas Hybond-N⁺ y como sondas se utilizaron los cDNA marcados con [α -³²P]dCTP

sintetizados a partir de RNA extraído de cada condición, teniendo entonces cuatro sondas: cDNA-0h, cDNA-1h, cDNA-6h y cDNA-12h. Con el objeto de tener suficiente DNA plasmídico para fijar en las membranas, las clonas de la genoteca SSH fueron cultivadas en medio LB para a partir de ellas purificar plásmido nuevamente. Se purificó plásmido de todas las clonas, excepto de cuatro que no pudieron ser recuperadas en medio LB (Pv-sshfwdtc-62, Pv-sshfwdtc-229, Pv-sshfwdtc-238 y Pv-sshfwdtc-245), por lo que los EST correspondientes no fueron incluidos en la hibridación tipo dot-blot. Las imágenes autorradiográficas obtenidas se escanearon y se guardaron como archivos (*.tif) para ser analizadas densitométricamente y asignar valores de expresión (en unidades arbitrarias) a cada EST en los diferentes tratamientos (fig. 14).

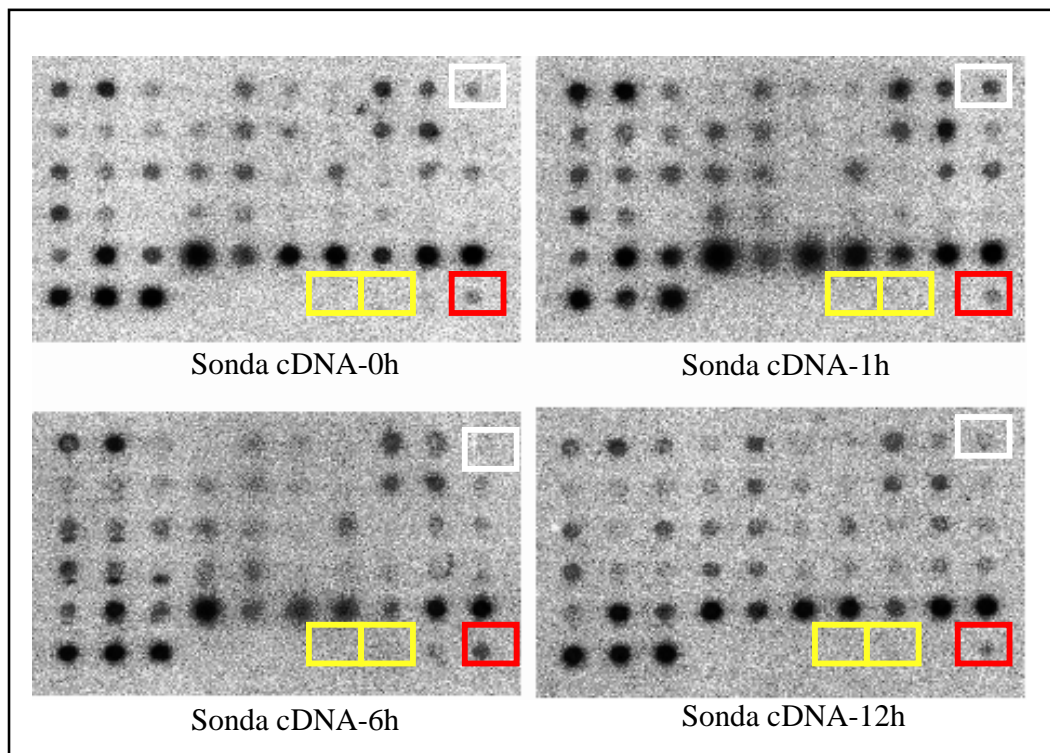
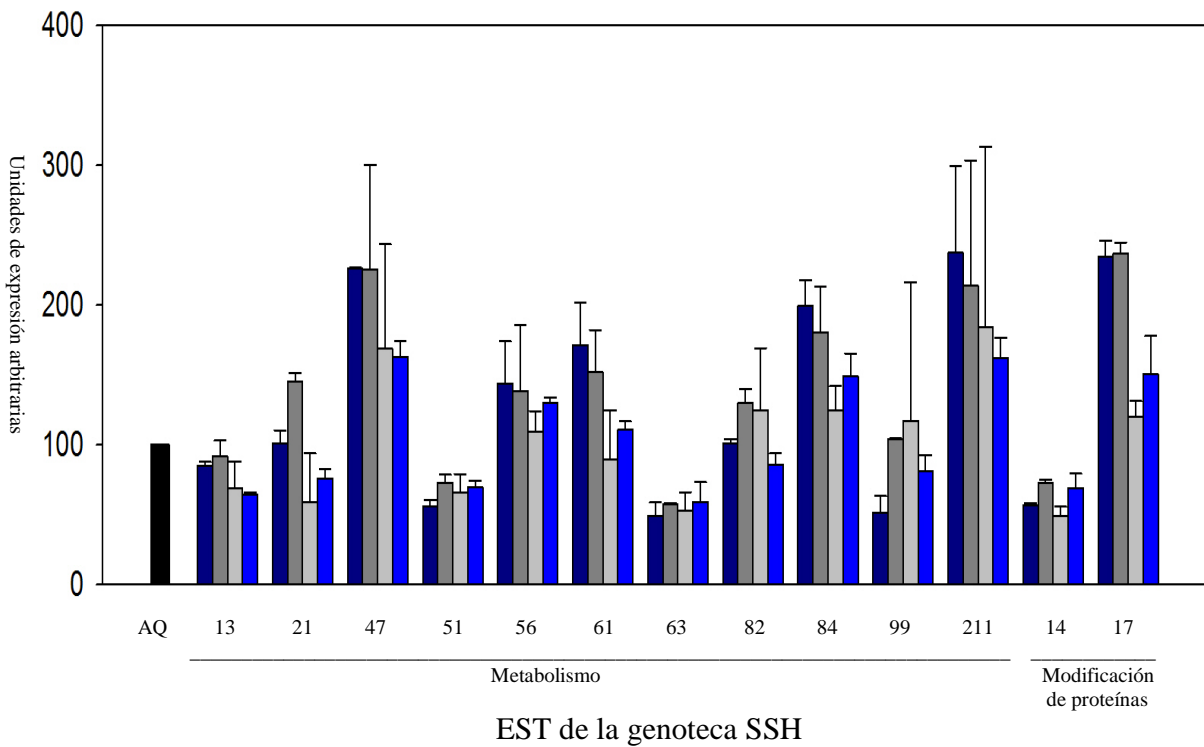


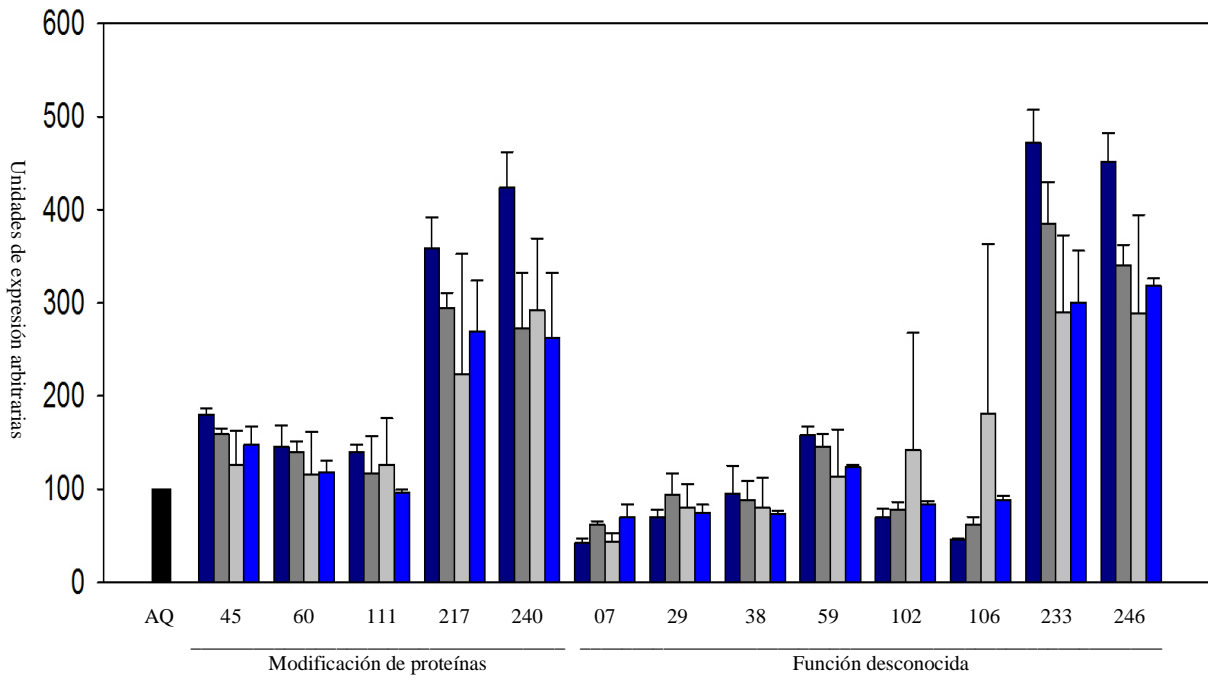
Fig. 14.-Hibridación de DNA tipo dot-blot. En las membranas se fijó DNA de los plásmidos purificados de las clonas de la genoteca SSH. Al pie de cada membrana se indica la sonda que se utilizó para hibridar. Los rectángulos blancos muestran una de las clonas (Pv-sshfwdtc-21, tubulina) cuyo nivel de expresión cambió en los distintos tratamientos. Los rectángulos amarillos muestran los controles negativos (agua y los *nested PCR primers* 1 y 2R del kit *Clontech PCR-Selected cDNA subtraction*). El rectángulo rojo muestra el control positivo (acuaporina).

A los valores de expresión resultantes se les aplicó la prueba estadística ANOVA para determinar si había diferencias significativas en el nivel de expresión; considerando como nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Los datos sugieren que el nivel de transcripción de nueve EST cambió significativamente con respecto al tiempo en que las raíces fueron expuestas a los FN: Pv-sshfwdtc-7, Pv-sshfwdtc-8, Pv-sshfwdtc-17 (doliquil difosfo oligosacárido glicosil transferasa), Pv-sshfwdtc-19 (transportador ABC), Pv-sshfwdtc-21 (tubulina), Pv-sshfwdtc-75, Pv-sshfwdtc-84 (carboxilasa), Pv-sshfwdtc-233 y Pv-sshfwdtc-234 (factor eIF5) (fig. 15).

Gráfica A

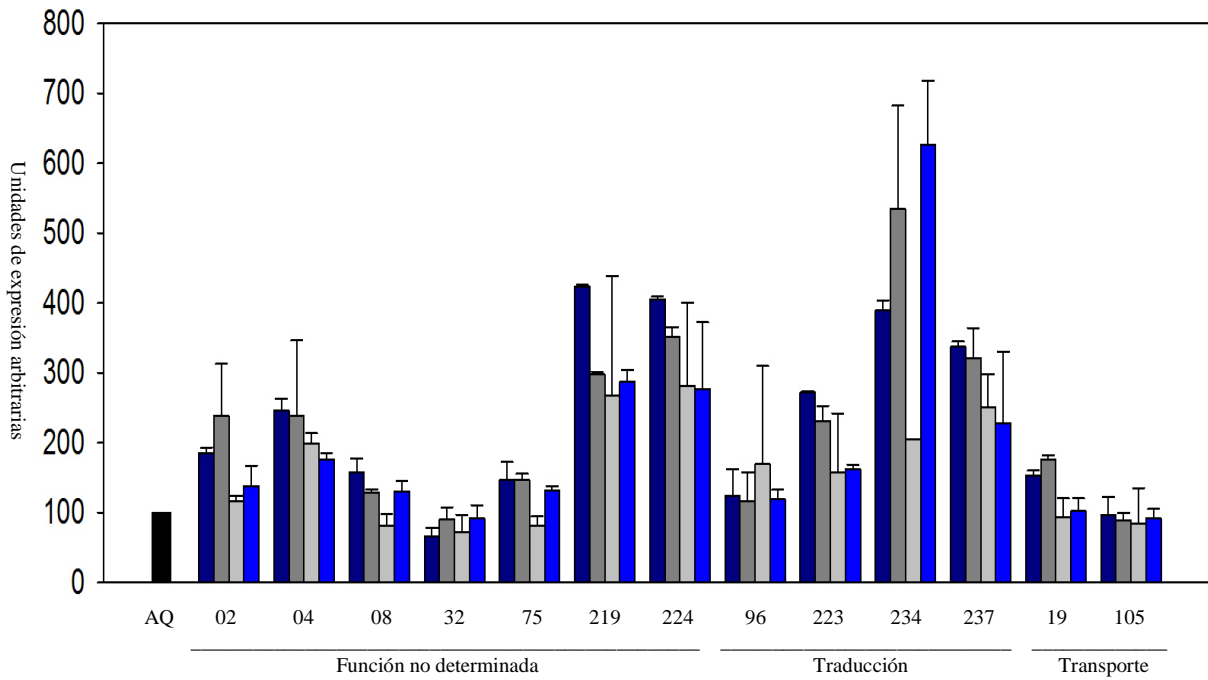


Gráfica B



EST de la genoteca SSH

Gráfica C



EST de la genoteca SSH

Gráfica D

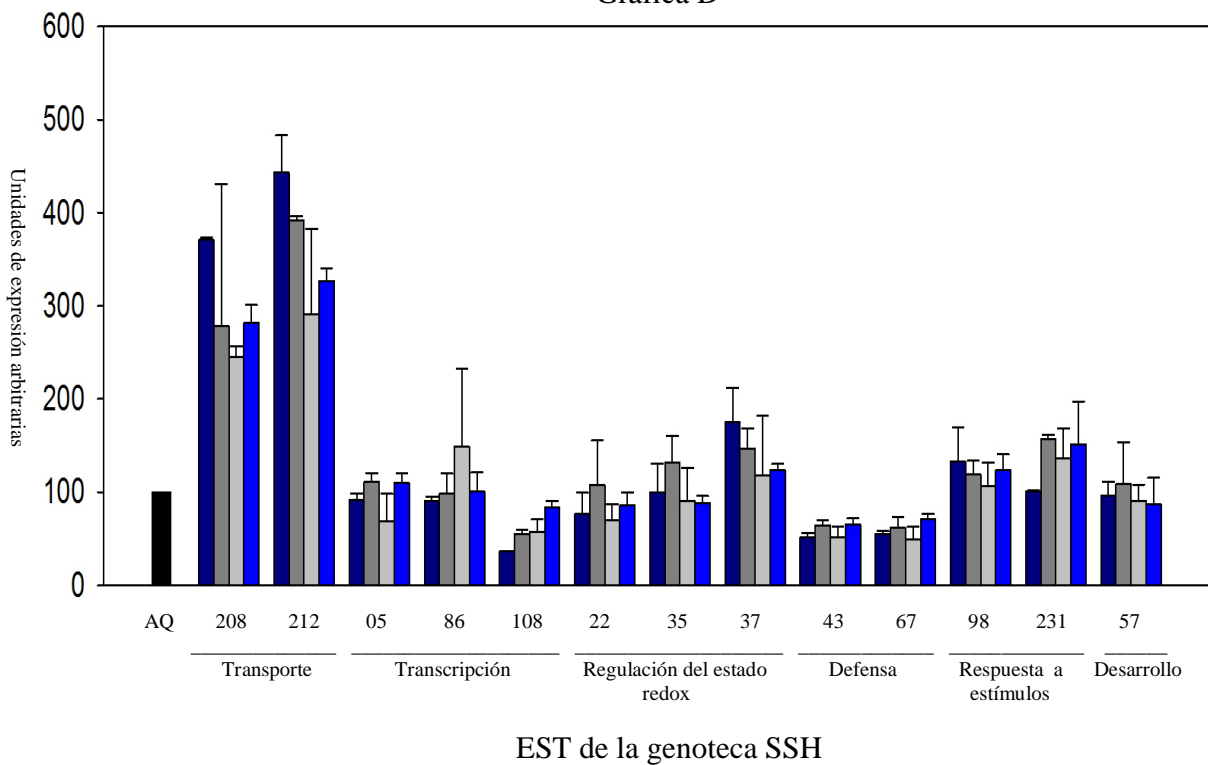


Fig.15.-Niveles de expresión de los EST de la genoteca SSH (Gráficas A-D). Los números debajo de cada grupo de barras, representan una nomenclatura abreviada de los EST (p. ej. 13 se refiere al EST Pvsshfwdtc-13). Control acuaporina (AQ, negro); expresión antes del tratamiento con FN (0 h, azul oscuro); expresión 1 h después del tratamiento (gris oscuro); expresión 6 h después del tratamiento (gris claro); expresión 12 h después del tratamiento (azul claro).

8.-DISCUSIÓN

Los 56 EST incluidos en la genoteca SSH obtenida en el presente trabajo, codifican proteínas muy diversas que forman parte de diferentes procesos celulares. Al haber sido aislados de raíces de *P. vulgaris* expuestas durante varias horas a FN de *R. etli* purificados, sus productos podrían jugar un papel importante en el establecimiento de la simbiosis. A continuación se discute la posible participación de las proteínas codificadas por estos EST durante los primeros eventos del proceso simbiótico.

Sobre los EST clasificados en la categoría de metabolismo.

La secuencia del EST Pv-sshfwdtc-13 es similar a la secuencia de una proteína de *G. max* con dominios α/β de barril de respuesta a estrés. No se pudo definir específicamente que tipo de proteína α/β de barril, sin embargo, proteínas con estos dominios suelen tener actividad enzimática, unirse a sustratos cargados negativamente y participar en reacciones metabólicas diversas (Wierenga, 2001; Nagano, *et al.*, 2002). La expresión de Pv-sshfwdtc-13 parece no ser inducida por los FN.

El EST Pv-sshfwdtc-21 codifica la cadena α -3 de la tubulina. Esta proteína es constituyente de los microtúbulos, estructuras cilíndricas íntimamente ligadas a la pared celular vegetal, que participan en el mantenimiento de la forma celular, regulación del crecimiento polar, morfogénesis y organización de la célula. Los microtúbulos están en constante repolimerización, lo que depende del estado de desarrollo de la célula o de la respuesta de ésta a estímulos ambientales (Goddard, *et al.*, 1994). Se ha reportado que los cambios morfológicos de los pelos radicales de leguminosas, en respuesta a los FN o a la presencia de rizobios compatibles, son debidos parcialmente a cambios en la estructura de los microtúbulos (Sieberer, *et al.*, 2005; Vassileva, *et al.*, 2005). No es de extrañar que se haya inducido la expresión del EST codificante de la tubulina después de que las raíces se trataron con los FN durante 1 h (aunque horas después la expresión disminuyó), ya que momentáneamente cesa el crecimiento polarizado del pelo, lo que provoca que su ápice se hinche para posteriormente reasumir el crecimiento en una nueva dirección. La dinámica de los microtúbulos puede ser un requisito para redirigir el crecimiento

del ápice del pelo, curvarlo y formar el punto de infección por donde entrarán los rizobios a la célula vegetal.

También fueron identificados EST codificantes de proteínas involucradas en la asimilación de nutrientes esenciales o aminoácidos, como Pv-sshfwdtc-47 que codifica a la adenililsulfato cinasa (APS-cinasa) o Pv-sshfwdtc-51 que codifica a la argininosuccinato sintasa. La APS-cinasa participa en la asimilación del azufre e indirectamente en la formación de metabolitos sulfatados secundarios como flavonoides, glucosinolatos y esteroides (Lillig, *et al.*, 2001; Mugford, *et al.*, 2009). La argininosuccinato sintasa participa en la vía de síntesis de arginina, aminoácido esencial en la síntesis de proteínas y uno de los más abundantes en cotiledones de algunas leguminosas (Soclum, 2005). Los niveles de expresión de los EST codificantes para estas proteínas, resultaron ser iguales o menores al nivel de expresión en la condición control respectiva.

Se aislaron EST que codifican para proteínas ampliamente estudiadas y caracterizadas en nódulos de *P. vulgaris* como la aspartato aminotransferasa (AAT), la asparagina sintetasa tipo II (AS), la AS tipo III y la lipoxigenasa (LOX). Las tres primeras participan en la asimilación del nitrógeno cuando el nódulo está desarrollado y no habían sido reportadas como inducidas durante las primeras horas de la simbiosis.

La AAT participa en la asimilación del nitrógeno reducido en ácido aspártico y asparagina. En nódulos de *P. vulgaris* se detectó la presencia de la PvAAT-2 codificada por un solo gene el cual es expresado principalmente en nódulos con mayor síntesis de amidas que de ureidos (Silvente, *et al.*, 2003). En cuanto al nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-99 que codifica la AAT, se observó que es inducido en respuesta a los FN. En etapas tempranas de la nodulación, la AAT podría estar participando en la catálisis y biosíntesis de aspartato o bien en la conversión de intermediarios de ácidos tricarbóxicos en aminoácidos.

La AS cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina al aspartato para generar glutamato y asparagina (Schubert, 1986). En *P. vulgaris* se han descrito varios genes AS con diferentes patrones de expresión. *PVAS1*, *PVAS2* y *PVAS3* se caracterizaron en la variedad Great

Northern (Osuna, *et al.*, 1999, 2001; Parra-Peralbo, *et al.*, 2001); mientras que, *PvASN2* se caracterizó en la variedad Negro Jamapa encontrando que se expresa en raíces, primordios de nódulo y sobre todo en nódulos maduros, donde podría participar en la destoxificación de amonio o en la regulación de la producción de ureidos o amidas (Silvente, *et al.*, 2008). En este trabajo se encontró que en las etapas iniciales de la simbiosis, el nivel de expresión *Pv-sshfwdtc-61* (codificante de la AS-II) fue mayor en todas las condiciones que el nivel de expresión de *Pv-sshfwdtc-63* (codificante de la AS-III). Para ambos casos, el nivel de expresión fue igual o menor a la condición control antes del tratamiento con los FN. En las etapas iniciales de la simbiosis, antes de la formación de nódulos maduros, la AS podría participar en la síntesis de proteínas.

Las LOX catalizan la adición de oxígeno molecular a ácidos grasos poliinsaturados para producir oxilipinas, compuestos requeridos para las respuestas de defensa o estrés (Porta y Rocha-Sosa, 2002). Hay varios reportes de proteínas LOX o acumulación de sus mRNA en nódulos de leguminosas como *V. faba*, *P. sativum* o *G. max* (Gardner, *et al.*, 1996; Perlick, *et al.*, 1996; Wisnieski, *et al.*, 1999; Hayashi, *et al.*, 2008), por lo que podrían participar en el proceso simbiótico. En nódulos de *P. vulgaris* se ha reportado la presencia de cinco LOX; la acumulación de las proteínas o de los transcritos, ha sido detectada principalmente en nódulos en desarrollo y disminuye conforme el nódulo alcanza la madurez (Porta y Rocha-Sosa, 2002). De las cinco LOX, se han caracterizado tres de ellas, *PvLOX2*, *PvLOX5* y *PvLOX6*. La transcripción de *PvLOX2*, no parece ser inducida por los FN o la bacteria, ya que el transcrito predomina tanto en raíces no infectadas como en nódulos; posiblemente la proteína está asociada a sitios con crecimiento activo (Porta, *et al.*, 1999). *PvLOX5* es exclusiva de raíces inoculadas y nódulos, la expresión de *PvLOX5* es consecuencia de la infección con *Rhizobium* por lo que podría tener un papel importante en el proceso simbiótico (Porta y Rocha-Sosa, 2000). *PvLOX6* es cloroplástica y se acumula en hojas que han sido heridas (Porta, *et al.*, 2008). El EST *Pv-sshfwdtc-56* aislado en este trabajo, codifica para *PvLOX4*. No se observó aumento del transcrito en respuesta a los FN.

Pv-sshfwdtc-84 codifica para la acetil CoA carboxilasa (ACCase). En plástidos, la ACCase cataliza la primera reacción de la síntesis de *novo* de los ácidos grasos. En citosol, la ACCase es necesaria para la elongación de los ácidos grasos de cadena larga y principalmente, para la

síntesis de flavonoides (Nikolau, *et al.*, 2003). Existen varios reportes en *P. vulgaris* o *A. thaliana* sobre la acumulación de la ACCasa citosólica como respuesta al ataque por patógenos (García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000; Figueroa-Balderas, *et al.*, 2006). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-84 disminuyó significativamente en las horas siguientes al tratamiento con los FN.

Dado que los FN inducen cambios en los pelos radicales y en las células corticales que se preparan para la infección y el desarrollo del primordio de nódulo, era predecible que la secuencia de algunos EST, aislados por SSH, fuera homóloga a la secuencia de proteínas relacionadas con la remodelación de la pared celular vegetal, como son: la xiloglucano endotransglucosidasa, la nucleótido ramnosa sintasa y la glicoproteína Fb15, esta última clasificada en la categoría de desarrollo y descrita más adelante.

La pared celular vegetal está compuesta por celulosa, hemicelulosas, pectinas, ramnogalacturonanos, proteínas estructurales y proteínas no estructurales. La hemicelulosa más abundante es el xiloglucano, que sirve como enlace entre microfibrillas de celulosa adyacentes. Durante la deposición de nuevo material de pared, la xiloglucano endotransglucosidasa (XET) cataliza el rompimiento intramolecular de un polímero de xiloglucano y transfiere el extremo potencialmente reductor recién generado a otra cadena de xiloglucano, manteniendo el espacio entre microfibrillas y el grosor de la pared, permitiendo la expansión celular (Fry, *et al.*, 1992; Nishitani y Tominaga, 1992). En *A. thaliana* se ha visto que hay una alta actividad y expresión de XET en tejidos en crecimiento, como son la zona de elongación de la raíz y la zona de inicio de los pelos radicales (Vissenberg, *et al.*, 2000; Vissenberg, *et al.*, 2001). En *L. japonicus* se buscaron genes abundantes en pelos radicales que sirvieran como indicadores en los primeros eventos de la simbiosis, identificando a *LjHI02* que codifica una XET (Maekawa, *et al.*, 2005). En otro estudio, se reportó que la concentración de GmXET1 en plántulas de *G. max* aumenta en respuesta a la inoculación con *B. japonicum* (Subramanian, *et al.*, 2009). En otras leguminosas se ha reportado un incremento en la expresión de proteínas XET como respuesta a la micorrización (Maldonado-Mendoza, *et al.*, 2005). En el presente trabajo, al analizar el nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-82 que codifica para la XET, se encontró que su expresión es inducida luego de 1 h de tratamiento con los FN; 6 h después, el nivel de expresión disminuye y 12 h después, el nivel de expresión es incluso menor que el nivel de expresión control.

La nucleótido-ramnosa sintasa/epimerasa-reductasa participa en la síntesis de L-ramnosa, componente de los ramnogalacturonanos y de diversos metabolitos secundarios como antocianinas, flavonoides, triterpenos, glicoproteínas vegetales y proteínas arabinogalactanas (Watt, *et al.*, 2004). En *A. thaliana* existen varias nucleótido-ramnosa sintasa/epimerasa-reductasas; interesantemente, AtRHM1 está involucrada de alguna manera en la formación de los pelos radicales, ya que una mutación en *AtRHM1* compensa el fenotipo mutante en la línea *lrx1* que se caracteriza por presentar pelos radicales deformados, con hinchamiento apical, bifurcación o que colapsan (Diet, *et al.*, 2006). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-211 que codifica para esta proteína, disminuye en respuesta al tratamiento con los FN. Lo que es contrastante con los niveles de expresión del EST que codifica para la XET, ya que ambos EST codifican proteínas participantes en la remodelación de la pared celular.

Sobre los EST clasificados en la categoría de modificación de proteínas.

En este análisis se identificaron un par de EST (Pv-sshfwdtc-14 y Pv-sshfwdtc-240) codificantes de componentes del sistema ubiquitina-proteasoma 26S (UPS), el cual participa en todos los aspectos fisiológicos de la planta: transducción de señales, señalización hormonal, morfogénesis, regulación de la expresión génica, respuestas a cambios ambientales, auto reconocimiento, defensa ante patógenos, entre muchos otros procesos. El UPS degrada proteínas con errores biosintéticos, proteínas que no adquieren su conformación nativa o proteínas normales. Puede actuar de forma constitutiva, modulando rápidamente la concentración de una proteína en respuesta a un aumento en su tasa de síntesis o actuar de forma regulada, en respuesta a una señal fisiológica (Zeng, *et al.*, 2006; Vierstra, 2009). Se ha reportado que el UPS participa en la degradación de las ciclinas, proteínas responsables de la progresión del ciclo celular, reactivando la división de las células corticales de la raíz para formar el primordio de nódulo luego de la percepción de los FN (Kondorosi, *et al.*, 2005). La expresión de Pv-sshfwdtc-14, que codifica para la subunidad β , aumentó 1 h y 12 h después de la percepción de los FN; mientras que la expresión de Pv-sshfwdtc-240, que codifica para la subunidad RPN1, fue menor después del tratamiento con los FN. Aunque ambas subunidades son componentes del proteasoma, se observaron niveles de expresión muy diferentes entre los EST que las codifican, siendo la expresión del EST codificante para RPN1 tres veces mayor que la expresión del EST codificante

de la subunidad β . Además de la reactivación del ciclo celular, es difícil establecer algún otro papel primordial del UPS en las primeras horas de la simbiosis, debido a la gran cantidad de procesos en los que participa.

En esta categoría fueron clasificados tres EST codificantes de proteínas de membrana, como son la doliquil difosfooligosacárido transferasa, la subunidad α del complejo COPI y una proteína con dedos de zinc tipo DHHC. La doliquil difosfooligosacárido transferasa está localizada en las caras citoplásmica y luminal de la membrana del retículo endoplásmico rugoso; transfiere el polisacárido glucosil-manosil-glucosamina presente en las cadenas laterales de las glicoproteínas, a un residuo asparagina en la secuencia Asn-Xaa-Ser o Asn-Xaa-Thr de los polipéptidos nacientes. La glicosilación de la asparagina es una modificación común en proteínas de membrana y de la vía secretora, provee una marca molecular que puede promover el plegamiento, la maduración y el control de calidad de una cadena peptídica (Kelleher y Gilmore, 2006). La expresión de Pv-sshfwdtc-17, codificante de la doliquil difosfooligosacárido transferasa, fue similar antes del tratamiento con los FN y 1 h después del tratamiento, disminuyendo después de 6 h de exposición a los FN.

COPI participa en el tráfico de membrana incluyendo transporte del retículo endoplásmico (RE) a Golgi, transporte dentro de Golgi, transporte de Golgi al RE y transporte a través de la vía endocítica (Hsu y Yang, 2009). En plantas existen múltiples genes que codifican para proteínas COPI, por lo cual existen distintas clases de vesículas cubiertas por COPI (Hwang y Robinson, 2009). En *P. sativum* se encontró altamente representada una proteína del complejo COPI en la membrana peribacteroidal, lo que en estados avanzados de la nodulación demuestra la participación de endomembranas en la formación del simbiosoma (Saalbach, *et al.*, 2002). La formación de vesículas resulta esencial para el tráfico de proteínas, pero se desconoce la participación específica que COPI pueda tener como resultado de la interacción planta-bacteria. No se presentan datos sobre los niveles de expresión de Pv-sshfwdtc-62, codificante de subunidad de COPI, ya que no se pudo crecer nuevamente a la clona de la genoteca SSH que contenía este EST.

Las proteínas con el dominio DHHC tienen actividad acil transferasa, actúan sobre otras proteínas modificando la cadena lateral de cisteínas, formando un palmitoil tioéster. La palmitoilación además de permitir a las proteínas anclarse a la membrana, es un proceso involucrado en el tráfico de proteínas, herencia de organelos y fusión de vesículas (Mitchell, *et al.*, 2006). En *A. thaliana*, mutantes en *TIP1* (gene que codifica una proteína con dominio DHHC y posiblemente con actividad acil transferasa) presentan diversas alteraciones. Los pelos radicales son anchos, cortos, frecuentemente ramificados y pueden emerger varios pelos de un mismo sitio de inicio; además están afectadas en la germinación y el crecimiento del tubo polínico, así como en el tamaño de las células epidérmicas del tallo; de modo que la palmitoilación es importante en la regulación del crecimiento (Hemsley, *et al.*, 2005). En las horas siguientes al tratamiento con los FN, la expresión de Pv-sshfwdtc-60 que codifica una proteína con dominio DHHC, fue igual o más baja que antes del tratamiento.

Se identificaron un par de EST (Pv-sshfwdtc-45 y Pv-sshfwdtc-217) que codifican proteínas con dominios similares a Ser/Thr cinasas (STK). Las STK reconocen a otras proteínas y las fosforilan en sitios específicos para activar o desactivar su actividad, regular su capacidad de interacción con otras moléculas o amplificar una señal generada ante un estímulo (Hanks y Hunter, 1995; Champion, *et al.*, 2004). Diversas STK como los RLK (receptores tipo cinasa) o las CaMK (cinasas cuya actividad es regulada por Ca^{2+} y calmodulina) han sido descritas como participantes indispensables de los primeros eventos de la nodulación. Las cinasas codificadas por los EST que aislamos estarían asociadas a eventos citoplásmicos de señalización, en estas primeras horas posteriores a la percepción de los FN. Al comparar el nivel de expresión de cada uno de los EST que codifican para las STK, se observa que Pv-sshfwdtc-217 se expresa mucho más que Pv-sshfwdtc-45 en todas las condiciones; sin embargo, en ambos casos, no hubo inducción de la expresión por efecto de los FN.

Otras proteínas que, como las STK, también forman parte de vías de señalización, son la prolil oligopeptidasa (POP) y la proteína fosfatasa 2C (PP2C). Las proteínas de la familia POP son endopeptidasas que no pueden hidrolizar péptidos que contengan más de 30 residuos, por lo que se piensa que son importantes en la señalización celular; en las plantas participan en el desarrollo general y en respuestas de defensa (Polgár, 2002). En las leguminosas *G. max* y *P. sativum* hay

sólo una POP y en *M. truncatula* hay dos POP, pero se conoce muy poco sobre la actividad de estas proteínas (Rawlings, *et al.*, 2008). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-111 que codifica a POP, disminuyó después del tratamiento con los FN.

Las PP2C son un tipo de serina/treonina fosfatasas que regulan muchos procesos celulares a través de la fosforilación y desfosforilación de proteínas. En *L. japonicus* se reportó que la expresión de *LjNPP2C1* aumenta significativamente en etapas tardías de la nodulación, cuando la planta ya ha desarrollado nódulos maduros; también se encontró que en mutantes afectadas en loci relacionados con la simbiosis, la expresión de este gene se altera, lo que sugiere que podría estar participando tanto en estados tardíos como en estados tempranos de la nodulación (Kapranov, *et al.*, 1999). En *G. max* se reportó la presencia de las fosfatasas KAPP1 y KAPP2 las cuales podrían estar regulando negativamente al receptor cinasa NARK, una vez que se ha inducido la división celular para formar el nódulo (Miyahara, *et al.*, 2008). No presentamos datos sobre el perfil de expresión de Pv-sshfwdtc-229, EST codificante de la PP2C.

Sobre los EST clasificados en la categoría de función desconocida.

En esta categoría están clasificados: Pv-sshfwdtc-07, Pv-sshfwdtc-29, Pv-sshfwdtc-38, Pv-sshfwdtc-59, Pv-sshfwdtc-102, Pv-sshfwdtc-106, Pv-sshfwdtc-233 y Pv-sshfwdtc-246. La secuencia de estos EST es similar a la secuencia de proteínas con función desconocida anotadas para especies como *G. max* y *Ricinus communis*. No fueron identificados posibles dominios que permitieran saber los tipos de proteínas codificadas por estos EST. El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-07, Pv-sshfwdtc-29 y Pv-sshfwdtc-106 aumentó por efecto de los FN. Para Pv-sshfwdtc-38, Pv-sshfwdtc-59 y Pv-sshfwdtc-102, el nivel de expresión fue igual o menor al nivel de expresión en la condición sin tratamiento. La expresión de Pv-sshfwdtc-233 y Pv-sshfwdtc-246 no fue inducida por los FN, incluso disminuyó a medida que el tratamiento con los FN fue prolongado.

Sobre los EST clasificados en la categoría de función no determinada.

En esta categoría se agruparon los EST: Pv-sshfwdtc-02, Pv-sshfwdtc-04, Pv-sshfwdtc-08, Pv-sshfwdtc-32, Pv-sshfwdtc-75, Pv-sshfwdtc-219 y Pv-sshfwdtc-224. Las secuencias de estos EST no fueron homólogas a las secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos; sin embargo, si fueron homólogas a secuencias de EST anotadas para *P. vulgaris*, *G. max* y *M. truncatula*. El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-02 aumentó 1 h después del tratamiento con los FN, pero después disminuyó. El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-04 bajó después de la adición de los FN; mientras que para el resto de los EST de este grupo, el nivel de expresión fue igual o menor al nivel de expresión en la condición sin tratamiento.

Sobre los EST clasificados en la categoría de traducción.

En la genoteca SSH están incluidos dos EST distintos (Pv-sshfwdtc-96 y Pv-sshfwdtc-234) que codifican al factor de inicio de la traducción 5A (eIF5A); que en plantas, es codificado por una familia multigénica. eIF5A puede estar en forma inactiva o activa; en la primera, participa en la síntesis de ciertas proteínas y en la segunda, facilita la translocación selectiva de mRNA específicos del núcleo hacia el citosol (Zanelli y Valentini, 2007). En *A. thaliana* existen tres isoformas con perfiles de expresión distintos; *AteIF5A-2* participa en la inducción de la muerte celular programada (MCP) luego de la invasión de *Pseudomonas syringae*. La supresión constitutiva de este factor produce un aumento en la resistencia a la MCP, ya que no hay colonización del patógeno ni desarrollo de los síntomas de defensa. La sobreexpresión, de este factor, provoca una MPC precoz (Hopkins, *et al.*, 2008). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-96 resultó ser igual o menor a la condición control. La expresión de Pv-sshfwdtc-234 parece aumentar 1 y 12 h después del tratamiento con los FN.

Pv-sshfwdtc-223 codifica para Nop56, proteína asociada a ribonucleoproteínas las cuales llevan a cabo la metilación y pseudouridilación secuencia-específica del rRNA, así como el procesamiento del pre-rRNA (Reichow, *et al.*, 2007). El nivel de expresión del EST que codifica esta proteína disminuyó después del tratamiento con los FN.

También se encontraron un par de EST (Pv-sshfwdtc-237 y Pv-sshfwdtc-245) que codifican para las proteínas ribosomales S25 y L32. Aunque se sabe que la función principal de las proteínas ribosomales es estabilizar estructuralmente al ribosoma, algunas de estas tienen actividades extraribosomales: reparación del DNA, modificación del DNA, regulación de la transcripción, crecimiento celular y apoptosis. En *Saccharomyces cerevisiae*, RPL32 interactúa con tres moléculas distintas de RNA y participa por lo menos en tres eventos distintos, procesamiento de pre-mRNA en el nucleólo, procesamiento del transcrito de *RPL32* en el núcleo y traducción del transcrito de *RPL32* ya procesado en el citoplasma (Vilardell y Warner, 1997). Se cree que en células de mamífero *RPS25* podría estar involucrado en la senescencia, aunque aún no se sabe cuales serían las implicaciones (Lavery y Goyns, 2002). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-237, disminuyó luego del tratamiento con los FN. El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-245 no fue cuantificado.

Sobre los EST clasificados en la categoría de transporte.

Las proteínas ABC están integradas a la membrana, generalmente participan en la importación o exportación de un amplio espectro de moléculas, aunque algunas pueden regular a otras proteínas (Theodoulou, 2000; Verrier, *et al.*, 2008). Las proteínas ABC son importantes en la interacción leguminosa-rizobio, desde los eventos iniciales como el intercambio de señales, hasta eventos posteriores como la asimilación de nutrientes. En *G. max*, la secreción de genisteína a la rizósfera está dada por un transportador ABC de raíz. En *L. japonicus* se identificaron 91 proteínas ABC mediante un análisis *in silico* y por análisis de RT-PCR se encontró que la expresión de algunos genes ABC es órgano específica e inducible en raíces inoculadas con *M. loti* (Sugiyama, *et al.*, 2007, 2008). En *M. truncatula* se identificaron 19 transportadores MtABCG; algunos de los transcritos que los codifican presentan un patrón de acumulación específico en nódulos o zonas particulares de la raíz luego de la infección con *S. meliloti* (Jasinski, *et al.* 2009). Los resultados en el presente análisis, sobre la expresión de Pv-sshfwdtc-19 que codifica un transportador ABC, muestran que su expresión aumentó luego de 1 h del tratamiento con los FN; lo que sugiere la participación del transportador en las etapas tempranas de la simbiosis.

Se aisló un EST (Pv-sshfwdtc-105) codificante de una leghemoglobina no simbiótica (nsHb). En general, las hemoglobinas participan en el transporte, percepción y destoxificación de O₂ o NO, así como en la transferencia electrónica; sin embargo, es probable que las nsHb no participen en el transporte de O₂ debido a su alta afinidad por el oxígeno y su constante de disociación baja para este gas (Garrocho-Villegas, *et al.*, 2007; Hoy y Hargrove, 2008). En *L. japonicus*, los genes *LjHB1* y *LjHB2* (que codifican para dos nsHb) se expresan en varios órganos, pero su expresión aumenta transitoriamente en nódulos. La expresión de *LjHB1* aumenta en condiciones de hipoxia, donde hay acumulación de NO; posiblemente *LjHB1* esté actuando para reducir el nivel de NO luego de la interacción de la planta con la bacteria y abortar la respuesta de defensa (Shimoda, *et al.*, 2005). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-105 codificante de la nsHb, fue el mismo en la condición control que durante los distintos tiempos de tratamiento con los FN.

El canal mitocondrial aniónico dependiente de voltaje (VDAC) es la proteína más abundante en la membrana mitocondrial externa de las plantas; entre sus posibles interactores se han encontrado enzimas glicolíticas y tRNA (Kusano, *et al.*, 2009). En *M. truncatula* y *G. max* hay cinco isoformas VDAC cuyo patrón de expresión es distinto según el órgano vegetal o el estado de desarrollo de la planta, su expresión también se ve afectada por estímulos bióticos o abióticos. En *L. japonicus* también hay cinco isoformas VDAC, la expresión de los genes que las codifican es constitutiva en todos los órganos de la planta y no se afecta por la inoculación con *M. loti*; en nódulos maduros, además de localizarse en las mitocondrias, los VDAC se localizan en pequeñas y numerosas vesículas situadas en la periferia de las células (Wandrey, *et al.*, 2004). En este trabajo, la expresión de Pv-sshfwdtc-208 que codifica para VDAC disminuyó por efecto de los FN.

Fue identificado un EST (Pv-sshfwdtc-212) codificante de un translocador ADP/ATP. Estas proteínas se localizan en diferentes compartimentos celulares. En mitocondrias, intercambian el ATP sintetizado en la matriz mitocondrial por ADP citosólico (Haferkamp, *et al.*, 2002). En cloroplastos, importan ATP para las reacciones nocturnas anabólicas y en los plástidos no verdes, proveen el ATP requerido para la síntesis de almidón y ácidos grasos (Kleppinger-Sparace, *et al.*, 1992; Reiser, *et al.*, 2004). En el retículo endoplásmico, importan el ATP requerido para la actividad de chaperonas, la glicosilación, la fosforilación de proteínas, el transporte de proteínas

entre el retículo endoplásmico y Golgi, etc. (Leroch, *et al.*, 2008). Aunque los translocadores ADP/ATP distribuyen la energía requerida para el metabolismo primario de la célula, también participan indirectamente en otros procesos celulares, como la respuesta de defensa ante patógenos. En plantas transgénicas de *Solanum tuberosum* donde la actividad del translocador AATP1(st) de plástidos es disminuída por un *AATP1(st)* antisentido, se encontró que en presencia del patógeno *Erwinia carotovora* o elicitores fúngicos, aumenta la acumulación del transcrito de genes de defensa (quitinasa, glucanasa, etc.) y aumenta también la liberación de H₂O₂ en el apoplasto. Los autores sugieren que al disminuir la actividad del translocador hay acumulación de ATP citosólico fácilmente disponible para iniciar una cascada de señalización dirigida a la respuesta de defensa (Linke, *et al.*, 2002). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-212 fue semejante entre los distintos tratamientos.

Sobre los EST clasificados en la categoría de transcripción.

Se encontró que Pv-sshfwdtc-05 codifica a la subunidad α del factor de transcripción TFIIE. TFIIE es un heterodímero que contiene a las subunidades TFIIE- α y TFIIE- β . La subunidad α tiene varios dominios funcionales principalmente en la región N-terminal que son indispensables para la transcripción basal, el crecimiento celular y la interacción de esta subunidad con la subunidad β , con Pol II y con otros factores de transcripción (Martinez, 2002; Di Lello, *et al.*, 2008). Se encontró que el nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-05 aumentó 1 y 12 h después de la aplicación de los FN. Este factor de transcripción actúa como parte de la maquinaria basal de las células, no hay reportes sobre una posible regulación diferencial.

El EST Pv-sshfwdtc-86 de la genoteca SSH, codifica una proteína con dedos de zinc tipo C2H2 (ZF-C2H2). Estas proteínas regulan la expresión génica a través de la remodelación de la cromatina e interactúan con DNA, RNA y proteínas. En general, participan en el desarrollo y en la respuesta a estrés o patógenos (Ciftci-Yilmaz y Mittler, 2008). En *M. truncatula* fue identificada una ZF-C2H2 que no había sido previamente reportada como inducida por nodulación; en dicho estudio se construyeron varias genotecas SSH, una de las cuales se hizo a partir de RNA obtenido de raíces de plantas inoculadas con *S. meliloti*. La proteína ZF-C2H2 encontrada fue identificada como homóloga a la proteína ID1 planta-específica que participa en

desarrollo. La inducción de esta proteína fue 70 veces mayor en nódulos (4 dpi) y 58 veces mayor en raíces noduladas (7 dpi) comparada con las raíces control, lo que sugiere que este regulador transcripcional podría estar participando en la formación del nódulo y en el proceso de infección (Godiard, *et al.*, 2007). A diferencia de lo que sucede en *M. truncatula*, se encontró que la expresión del EST Pv-sshfwdtc-86 que codifica para un ZF-C2H2, es igual en raíces sin tratar con los FN que en raíces tratadas con los FN durante distintos tiempos.

Pv-sshfwdtc-108 es codificante de una RNA helicasa de la familia DEAD-box. Las helicasas de la familia DEAD-box participan en el inicio de la traducción, el rearrreglo estructural del RNA y de la ribonucleoproteína, la separación del RNA de doble cadena, el apareamiento complementario del RNA, el intercambio de la cadena de RNA y en el desplazamiento de proteínas en el RNA (Linder y Owtrrim, 2009). En *A. thaliana* existen DEAD-box helicasas codificadas por más de 100 genes, algunos son expresados de forma tejido-específica, otros se expresan constitutivamente y otros aumentan su expresión en respuesta a algún tipo de estrés (Mingam, *et al.*, 2004). En *O. sativa* se identificó por la técnica de SSH una clona de cDNA que codifica para la RNA helicasa OsBIRH1, inducida por la inoculación con el hongo *Magnaporthe grisea*. La expresión de *OsBIRH1* es activada por la infección por patógenos y por el tratamiento con moléculas señal relacionadas con la resistencia a enfermedades. La sobreexpresión ectópica de este gene en plantas transgénicas de *A. thaliana* aumenta la expresión de genes relacionados con defensa (*PR-1*, *PR-2* y *PR-5*) y aumenta la resistencia a estrés oxidativo (al inducir la expresión de peroxidasas), esta helicasa funciona como un regulador positivo en la respuesta de defensa contra estrés biótico y estrés abiótico (Li, *et al.*, 2008). Se encontró que la expresión de Pv-sshfwdtc-108 se indujo por efecto de los FN. El nivel de expresión fue en aumento de acuerdo con el tiempo que las raíces estuvieron expuestas a los FN, presentando la mayor expresión en las raíces expuestas a los FN durante 12 h. Este es uno de los pocos EST, cuya expresión fue claramente inducida. Esta RNA helicasa podría tener un papel importante en las primeras horas de la interacción simbiótica.

La proteína RAMP4 está asociada al poro de translocación cotraduccional en la membrana del retículo endoplásmico (RE). En células de mamífero, RAMP4 ayuda a que los polipéptidos salgan pausadamente a través del poro de translocación, para que puedan ser glicosilados

eficientemente (Schröder, *et al.*, 1999). Cuando las células son expuestas a condiciones que provocan la acumulación de proteínas no plegadas en el RE, hay inducción de chaperonas y proteínas de la maquinaria de translocación, como RAMP4, cuya sobreexpresión estabiliza y facilita la glicosilación de proteínas de membrana durante y después de la condición de estrés (Yamaguchi, *et al.*, 1999). No se presentan datos sobre la expresión de Pv-sshfwdtc-238 codificante de RAMP4.

Sobre los EST clasificados en la categoría de regulación del estado redox.

Los citocromos P450 (CYP) participan en la óxido-reducción de numerosos compuestos endógenos y exógenos. En plantas, participan en una gran cantidad de vías metabólicas: síntesis y metabolismo de fenilpropanoides y terpenoides, síntesis de los ácidos abscísico y jasmónico, catabolismo del ácido giberélico, síntesis de algunos aminoácidos, síntesis de esteroides, metabolismo de carbohidratos de pared celular, metabolismo de almidón y sacarosa, síntesis de clorofila y son componentes importantes de fotosistemas (Bolwell, *et al.*, 1994; Cytochrome P450 Website, <http://drnelson.utmem.edu>). En la simbiosis *Phaseolus-Rhizobium*, la citocromo P450 isoflavona sintasa es importante en la generación de naringenina, principal quimioatrayente de los rizobios e inductora de los genes bacterianos *nod* (Jung, *et al.*, 2000). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-22, codificante de un CYP, fue igual o menor en todas las condiciones de tratamiento.

Pv-sshfwdtc-35 es codificante de una β -amirina soforadiol hidroxilasa; esta enzima hidroxila triterpenos como β -amirina y soforadiol, lo que resulta en la formación de precursores del ácido oleanólico y del soyasapogenol. Estos compuestos tienen una gran variedad de funciones ya que son constituyentes de membrana, precursores de hormonas, alelopáticos, antimicrobianos y en general están involucrados de distintas maneras en el desarrollo de la planta. *G. max*, *M. truncatula*, *P. sativum* y las leguminosas en general, producen la mayor variedad de triterpenos y aunque son acumulados principalmente en raíces, se encuentran en todos los tejidos de la planta (Shibuya, *et al.*, 2006; Vincken *et al.*, 2007). El nivel de expresión del EST codificante de esta enzima fue igual o menor a la expresión en la condición control.

Otro EST relacionado con la regulación del estado redox fue Pv-sshfwdtc-37, que codifica a la aldehído deshidrogenasa (ALDH). Los aldehídos son intermediarios en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, aminoácidos, proteínas o esteroides; pueden resultar tóxicos para las células si se acumulan en cantidad excesiva. Una de las principales vías de detoxificación de aldehídos, es la oxidación de sus grupos carbonilo en ácidos carboxílicos por la ALDH. Las ALDH2C son una familia de proteínas que pueden ser mitocondriales o citosólicas (Kirch, *et al.*, 2004); en *A. thaliana* se caracterizó una ALDH2C4 citosólica que oxida acetaldehído y glicolaldehído para generar compuestos esterificados de pared celular (Nair, *et al.*, 2004). También se han encontrado ortólogos a *ALDH2C4* en *O. sativa* como: *OsALDH2-1*, *OsALDH2-2* y *OsALDH2-3* los cuales se expresan principalmente en raíces jóvenes, pero se desconoce el proceso específico en el que están participando (Gao y Han, 2009). En el presente trabajo, la expresión del transcrito de *ALDH2C* no fue inducida por los FN, ya que no hubo diferencias en los niveles de expresión durante los distintos tiempos del tratamiento.

Sobre los EST clasificados en la categoría de defensa.

Las proteínas relacionadas a patogénesis (PRP) se clasifican en 17 familias y son inducibles luego de la infección por patógenos, ataque de insectos, tratamiento con ácido jasmónico, etileno o ácido salicílico, además de estar involucradas en desarrollo. Sus funciones son diversas, las hay con actividad de proteasa, peroxidasa, quitinasa, oxidasa, glucanasa, ribonucleasa, etc; sin embargo, se desconoce la función de los miembros de la familia PR-1 que es la más abundante. En *A. thaliana* existen 22 genes que codifican proteínas PR-1, pero sólo uno es inducible por patogénesis (van Loon *et al.*, 2006). En *O. sativa* se han reportado 39 genes que codifican proteínas PR-1, doce de ellos son inducibles por patógenos, lo que contrasta con lo reportado para *A. thaliana* (Mitsuhara *et al.*, 2008). En *M. truncatula* se identificó una clona de cDNA cuya secuencia es homóloga a una PR-1, la clona se aisló de un banco de cDNA construido a partir de raíces expuestas durante 24 h a *R. meliloti*; aunque el transcrito no es exclusivo de raíces, se encontró que el nivel de expresión aumenta en este órgano luego de la exposición de la planta a la bacteria (Szybiak-Strozycka, *et al.*, 1995). A diferencia de lo reportado para *M. truncatula*, el perfil de expresión de Pv-sshfwdtc-43, codificante de la PR-1, fue igual en todas las condiciones de tratamiento.

Pv-sshfwdtc-67, uno de los EST de la genoteca SSH, codifica para una proteína tipo SOBER1. Esta proteína es una α/β hidrolasa con actividad fosfolipasa y carboxilesterasa con especificidad por un amplio rango de sustratos. En una línea mutante de *A. thaliana* se identificó una mutación que ocasiona la pérdida de función de *SOBER1*, como resultado de la mutación, esta línea es resistente al patógeno *Xanthomonas campestris*; en estas plantas se acumula ácido fosfatídico, el cual podría actuar como segundo mensajero en cascadas de señalización de respuesta a estrés y a patógenos (Cunnac, *et al.*, 2007). En plantas que sobreexpresan SOBER1 no hay acumulación de ácido fosfatídico ni se induce la respuesta hipersensible, por lo que el ácido fosfatídico o alguno de sus precursores podrían ser los sustratos de SOBER1 (Kirik y Mudgett, 2009). La expresión del EST codificante para la proteína tipo SOBER1, fue igual en todas las condiciones de tratamiento.

El encontrar EST codificantes de proteínas de defensa es coherente con el hecho de que al inicio del proceso de nodulación, la planta responde inicialmente como si percibiera a un agente patógeno y no a un simbiote benéfico.

Sobre los EST clasificados en la categoría de respuesta a estímulos.

Las proteínas pequeñas de choque térmico (sHsp) se encuentran en citosol, plástidos, retículo endoplásmico y mitocondrias; no necesariamente están involucradas con la termotolerancia, ya que la transcripción de algunos de los genes que las codifican puede ser inducida en distintas condiciones de estrés o en un estado de desarrollo específico de la planta (Sun, *et al.*, 2002). Las sHsp se unen a proteínas parcialmente desnaturalizadas, previniendo su agregación, para que puedan plegarse nuevamente cuando el estrés ha terminado; se unen con elementos del citoesqueleto regulando su organización espacial y se unen a lípidos de membrana protegiéndolos de la oxidación. También se ha visto que interactúan con DNA de cadena sencilla, DNA de doble cadena y con el mRNA, aunque no se sabe si la interacción es directa o indirecta (Sun y MacRae, 2005). El perfil de transcripción de Pv-sshfwdtc-98 codificante de la sHsp fue igual en todas las condiciones de tratamiento.

El DNA dentro del núcleo de las células eucariontes está empaquetado junto con histonas y otras proteínas formando la cromatina; esta organización influye en el control transcripcional, replicación, reparación y recombinación. Además de la información contenida dentro de la secuencia de ADN, existen modificaciones que no alteran el código genético y que enriquecen su información como es la modificación en los extremos N-terminales de las histonas y la presencia de variantes de histonas en ciertas regiones genómicas. La histona H4 está muy conservada y su extremo N-terminal, accesible fuera del complejo nucleosomal, posee residuos susceptibles de modificación (Sánchez, *et al.*, 2008). En un estudio en raíces de leguminosas sobre el ciclo celular durante los distintos estados de la nodulación, se analizó la expresión de *H4* (y otros genes considerados como marcadores moleculares de la división celular). En plantas inoculadas con *Rhizobium* o FN purificados, se induce la expresión de *H4* en las células corticales de la raíz que están en estado G₀/G₁ y que luego son reactivadas por efecto de los FN. También se encontró que *H4* se expresa en células corticales que se preparan para formar el hilo de infección y cuyo ciclo celular no progresa a mitosis durante la nodulación (Yang, *et al.*, 1994). Los datos en el presente análisis concuerdan con lo obtenido por Yang *et al* (1994), ya que el nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-231, codificante de H4, aumenta en las raíces de *P. vulgaris* después del tratamiento con los FN; lo que efectivamente indica la participación de la H4 en las primeras horas del establecimiento de la simbiosis, cuando los FN inducen la división de las células corticales.

Sobre el EST clasificado en la categoría de desarrollo.

Fb15 es una proteína rica en prolina de la superfamilia de proteínas con arabinogalactano (AGP). Fue identificada por primera vez en *Gossypium hirsutum* (algodón), donde participa en el depósito de pared celular secundaria en la elongación de las fibras desarrolladas a partir de la epidermis del óvulo (John y Keller, 1995). En general, las AGP son glicoproteínas vegetales asociadas a la membrana o presentes en la matriz extracelular; participan en diversos procesos, como: división celular, muerte celular programada, desarrollo embrionario, crecimiento, señalización e interacción con patógenos y simbiontes (Seifert y Roberts, 2007). En leguminosas, las proteínas ENOD5, ENOD16, ENOD20 y MtN12, también conocidas como nodulinas tempranas, son codificadas por genes inducidos durante la infección con rizobios; todas son

glicoproteínas ricas en prolina con motivos AGP, pero su función específica no ha sido establecida claramente durante el proceso simbiótico (Brewin, 2004). El nivel de expresión de Pv-sshfwdtc-57 que codifica a Fb15, no cambió en los distintos tratamientos. Fb15 podría ser parte de la maquinaria de remodelación de la pared celular vegetal ya que en las etapas tempranas de la nodulación hay inducción de la división de las células corticales por efecto de los FN.

Al analizar el perfil de expresión de los EST de la genoteca SSH, en la mayoría de ellos no se observan diferencias significativas de expresión durante las distintas horas de tratamiento con los FN; posiblemente esto se deba más al método usado para este propósito (hibridación de DNA tipo dot-blot) que al hecho de que realmente no existan cambios en los niveles de expresión. Como se ha explicado en secciones anteriores, el establecimiento de la nodulación implica cambios dinámicos en la maquinaria de transcripción de las células corticales de la raíz que se preparan para la infección. Están descritos cambios fisiológicos que tienen lugar en estas células vegetales, incluso segundos después de la percepción de los FN. Los resultados aquí obtenidos proporcionan un estimado de los niveles de transcripción; para obtener una cuantificación precisa tendrán que utilizarse técnicas con mayor sensibilidad como son el Northern o la PCR en tiempo real.

La abundancia y la clasificación funcional de los EST incluidos en la genoteca SSH no dista mucho de lo reportado por Meschini, *et al.* (2008), en donde se analizaron transcritos expresados en estados tempranos de la simbiosis entre *P. vulgaris* y dos cepas de *R. etli* provenientes de diferentes regiones del continente americano, con el fin de identificar genes involucrados en el establecimiento simbiótico preferencial entre plantas y bacterias de la misma región geográfica. Los autores encontraron que 41 EST se expresan diferencialmente en los pelos radicales de *P. vulgaris* 24 h postinoculación, el 95% de los EST tiene similitud con secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos y el 5% restante codifica para proteínas con función desconocida. En el presente trabajo se encontró que el 73% de los EST es similar a la secuencia de proteínas reportadas, el 14% es similar en secuencia a proteínas con función desconocida y el 13% no tuvo similitud con otras secuencias proteicas descritas pero si con EST reportados en leguminosas, los cuales podrían representar genes aún no descritos en las bases de datos.

Algunos de los EST aquí identificados como codificantes de las proteínas lipoxigenasa, S/T cinasas, asparagina sintetasa, aldehído deshidrogenasa y proteínas ribosomales, también están entre los EST reportados por Meschini, *et al* (2008).

En un estudio similar, Lohar, *et al.* (2006) analizaron el perfil de transcripción de genes expresados en raíces de *M. truncatula* durante 72 h postinoculación (hpi) con *S. meliloti*; encontrando que 1 hpi se induce la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con respuestas de defensa, enfermedad, estrés, citomorfogénesis, pared celular y de unión a calcio y que entre 6 y 12 hpi se induce la expresión de genes que codifican proteínas participantes en la biosíntesis de flavonoides, estructura del citoesqueleto, pared celular, peroxidasas y ciclo celular. La clasificación funcional de los EST identificados en el presente trabajo es concordante con lo reportado por Lohar, *et al.* (2006), además, se encontró que en frijol se expresan varios EST codificantes de proteínas que participan en vías de señalización, transcripción, traducción, modificación de proteínas y transporte.

9.-CONCLUSIÓN

El análisis de las secuencias obtenidas de la genoteca SSH permitió reconocer 56 EST, los cuales representan genes que codifican proteínas con diversas funciones durante las primeras horas del establecimiento de la simbiosis. La secuencia de la mayoría de los EST reportados en este trabajo es homóloga a la secuencia de proteínas que han sido caracterizadas previamente por otros autores; sin embargo, en algunos reportes, el papel de dichas proteínas no ha sido estudiado en el contexto de la relación simbiótica leguminosa-rizobio. También encontramos EST anotados como de función desconocida y otros EST cuya secuencia no fue identificada a nivel de proteína pero que han sido reportados como EST de leguminosas.

La información obtenida en este trabajo es valiosa ya que se identificaron algunos EST expresados diferencialmente en las 12 h siguientes al tratamiento con los FN específicos, lo que nos permite saber qué tipo de genes son inducidos o reprimidos transcripcionalmente en las raíces de la planta durante los eventos tempranos de la nodulación.

Perspectivas:

La función de algunos de los genes correspondientes a los EST aquí identificados, será determinada mediante genética reversa (silenciamiento y/o sobreexpresión) para así definir su participación en las etapas iniciales de la interacción frijol-rizobio.

BIBLIOGRAFÍA

Ané, J. M., Kiss, G. B., Riely, B. K., Penmetsa, R. V., Oldroyd, G. E. D., Ayax, C., Lévy, J., Debellé, F., Baek, J. M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B. A., Long, S. R., Dénarié, J. and Cook, D. R. 2004. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*. **303**: 1364- 1367.

Arp, D. J. 2000. The nitrogen cycle. En: Prokariotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. Triplett, E.W. (ed). Wymondham: Horizon Scientific Press. pp. 1-14.

Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S. and Vivanco, J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol*. **57**: 233-266.

Ben Amor, B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., Long, S. R., Denarie, J. and Gough, C. 2003. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant Journal*. **34**: 495-506.

Bolwell, G. P., Bozak, K. and Zimmerlin, A. 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*. **37** (6): 1491-1505.

Brencic, A. and Winans, S. C. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. **69** (1): 155-194.

Brewin, N. J. 2004. Plant cell wall remodeling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit Rev in Plant Sci*. **23** (4): 293-316.

Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)-model food legumes. *Plant and Soil*. **252**: 55-128.

Cárdenas, L., Alemán, E., Nava, N., Santana, O., Sánchez, F. and Quinto, C. 2006. Early responses to Nod factors and mycorrhizal colonization in a non-nodulating *Phaseolus vulgaris* mutant. *Planta*. **223** (4): 746-754.

Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J. J. Spaink, H. P., Rademaker, G. J. Haverkamp, J. and Thomas-Oates, J. E. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol*. **29**: 453-464.

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

- Cárdenas, L., Hepler, P., Sánchez, F. and Quinto, C.** 2002. Early responses in the *Rhizobium*-legume interaction. *Recent Res Devel Plant Physiol.* **3**: 1-5.
- Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F. and Quinto, C.** 2008. Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant Journal.* **56**: 802-813.
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P. K. and Quinto, C.** 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* **116**: 871-877.
- Catalano, C. M., Czymmek, K. J., Gann, J. G. and Sherrier, D. J.** 2007. *Medicago truncatula* syntaxin SYP132 defines the symbiosome membrane and infection droplet membrane in root nodules. *Planta.* **225**: 541-550.
- Cermola, M., Fedorova, E., Taté, R., Riccio, A., Favre, R. and Patriarca, E. J.** 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *MPMI.* **13** (7): 733-741.
- Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A. and Henry, Y.** 2004. *Arabidopsis* kinome: after the casting. *Funct Integr Genomics.* **4**: 163-187.
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E. and Parniske, M.** 2008. *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell.* **20**: 3467-3479.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162** (1): 156-159.
- Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R.** 2008. The zinc finger network of plants. *Cell Mol Life Sci.* **65**: 1150-1160.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J. and Udvardi, M. K.** 2004. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant Journal.* **39**: 487-512.
- Colebatch, G., Kloska, S., Trevaskis, B., Freund, S., Altmann, T. and Udvardi, M. K.** 2002. Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *MPMI.* **15** (5): 411-420.
- Cunnac, S., Wilson, A., Nuwer, J., Kirik, A., Baranage, G. and Mudgett, M. B.** A conserved carboxylesterase is a SUPPRESSOR OF AVRBS-ELICITED RESISTANCE in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **19**: 688-705.
- Davis, J. H. C., Giller, K. E., Kipe-Nolt, J. and Awah, M.** 1988. Non-nodulating mutants in common bean. *Crop Sci.* **28**: 859-860.

- Di Lello, P., Jenkins, L. M. M., Mas, C., Langlois, C., Malitskaya, E., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., Legault, P. and Omichinski, J. G.** 2008. p53 and TFIIE α share a common binding site on the Tfb1/p62 subunit of TFIIF. *PNAS*. **105**: 106-111.
- Diatchenko, L., Chris Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D.** 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *PNAS*. **93**: 6025-6030.
- Diet, A., Link, B., Seifert, G. J., Schellenberg, B., Wagner, U., Pauly, M., Reiter, W. D. and Ringli, C.** 2006. The *Arabidopsis* root hair cell wall formation mutant *lrx1* is suppressed by mutations in the *RHM1* gene encoding a UDP-L-rhamnose synthase. *Plant Cell*. **18**: 1630-1641.
- El Yahyaoui, F., Kuster, H., Ben Amor, B., Hohnjec, N., Puhler, A., Becker, A., Gouzy, J., Vernié, T., Gough, C., Niebel, A., Godiard, L. and Gamas, P.** 2004. Expression profiling in *Medicago truncatula* identifies more than 750 genes differentially expressed during nodulation, including many potential regulators of the symbiotic program. *Plant Physiol*. **136**: 3159-3176.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P. and Kiss, G.B.** 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*. **417**: 962-966.
- Fåhræus, G.** 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol*. **16**: 374-381.
- Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P. A., Cho, J., Town, C. D., VandenBosch, K. A., Gantt, J. S. and Vance, C. P.** 2002. Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*. **130**: 519-537.
- Felle, H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. and Shultze, M.** 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signaling in *Medicago sativa*. *Plant Journal*. **13**: 455-463.
- Figueroa-Balderas, R. E., García-Ponce, B. and Rocha-Sosa, M.** 2006. Hormonal and stress induction of the gene encoding common bean acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol*. **142**: 609-619.
- Fry, S. C., Smith, R. C., Renwick, K. F., Martin, D. J., Hodge, S. K. and Matthews, K. J.** 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J*. **282**: 821-828.
- Gage, D. J.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*. **68**: 280-300.
- Gao, C. and Han B.** 2009. Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*). *Gene*. **431**: 86-94.

- García-Ponce, B. and Rocha-Sosa, M.** 2000. The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multifunctional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* **157**: 181-190.
- Gardner, C. D., Sherrier, D. J., Kardailsky, I. V. and Brewin, N. J.** 1996. Localization of lipoxygenase proteins and mRNA in pea nodules: identification of lipoxygenase in the lumen of infection threads. *MPMI.* **9**: 282-289.
- Garrocho-Villegas, V., Gopalasubramaniam, S. K. and Arredondo-Peter, R.** 2007. Plant hemoglobins: what we know six decades after their discovery. *Gene.* **398**: 78-85.
- Gibly, A., Bonshtien, A., Balaji, V., Debbie, P., Martin, G. B. and Sessa, G.** 2004. Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *MPMI.* **17** (11): 1212-1222.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B. W. and Oldroyd, G. E. D.** 2006. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature.* **441**: 1149- 1152.
- Goddard, R. H., Wick, S. M., Silflow, C. D. and Snustad, D. P.** 1994. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiol.* **104**: 1-6.
- Godiard, L., Niebel, A., Micheli, F., Gouzy, J., Ott, T. and Gamas, P.** 2007. Identification of new potential regulators of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis using a large-scale suppression subtractive hybridization approach. *MPMI.* **20** (3): 321-332.
- Gough, C.** 2003. *Rhizobium* symbiosis: insight into Nod factor receptors. *Curr Biol.* **13**: R973-R975.
- Haferkamp, I., Hackstein, J. H., Voncken, F. G., Schmit, G. and Tjaden, J.** 2002. Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *Eur J Biochem.* **269**: 3172–3181.
- Hanks, S. K. and Hunter, T.** 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**: 576-596.
- Hayashi, S., Gresshoff, P. M. and Kinkema, M.** 2008. Molecular analysis of lipoxygenases associated with nodule development in soybean. *MPMI.* **21** (6): 843-853.
- Hemsley, P. A., Kemp, A. C. and Grierson, C. S.** 2005. The TIP GROWTH DEFECTIVE1 S-acyl transferase regulates plant cell growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **17**: 2554-2563.
- Hirsch, A. M.** 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol.* **2**: 320-326.

- Hirsch, A. M., Lum, M. R. and Downie, A.** 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* **127**: 1484-1492.
- Hirsch, A. M. and Smith, C.A.** 1987. Effects of *Rhizobium meliloti nif* and *fix* mutants on alfalfa root nodule development. *J Bacteriol.* **169** (3): 1137-1146.
- Hopkins, M. T., Lampi, Y., Wang, T. W., Liu, Z. and Thompson, J. E.** 2008. Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **148**: 479-489.
- Hoy, J. A. and Hargrove, M. S.** 2008. The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiol Biochem.* **46**: 371-379.
- Hsu, V. W. and Yang, J. S.** 2009. Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett.* Doi:10.1016/j.febslet.2009.10.056
- Hungria, M., Joseph, C. M. and Phillips, D.A.** 1991. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **97**: 759-764.
- Hwang, I. and Robinson, D. G.** 2009. Transport vesicle formation in plant cells. *Curr Opin Plant Biol.* **12**: 1-10.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J. A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G. J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M. and Hayashi, M.** 2005. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature.* **433**: 527-531.
- Jasinski, M., Banasiak, J., Radom, M., Kalitkiewicz, A. and Figlerowicz, M.** 2009. Full-size ABC transporters from the ABCG subfamily in *Medicago truncatula*. *MPMI.* **8**: 921-931.
- John, M. E. and Keller, G.** 1995. Characterization of mRNA for a proline-rich protein of cotton fiber. *Plant Physiol.* **108**: 669-676.
- Jung, W., Yu, O., Lau, S. M. C. O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G. and McGonigle, B.** 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnology.* **18**: 208-212.
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R. M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S. R., Rogers, J., Kiss, G. B., Downie, J. D. and Oldroyd, G. E. D.** 2005. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science.* **308**: 1786-1789.
- Kanamori, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E. M. H., Miwa, H., Downie, J. A., James, E. K., Felle, H. H., Haaning, L. L., Jensen, T. H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J.** 2006. A nucleoporin is required for induction of

Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. PNAS. **103** (2) : 359-364.

Kapranov, P., Jensen, T. J., Poulsen, C., de Bruijn, F. J. and Szczyglowski, K. 1999. A protein phosphatase 2C gene, *LjNPP2C1*, from *Lotus japonicus* induced during root nodule development. PNAS. **96**: 1738-1743.

Kelleher, D. J. and Gilmore, R. 2006. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. Glycobiology. **16** (4): 47R-62R.

Kirch, H. H., Bartels, D., Wei, Y., Schnable, P. S. and Wood, A. J. 2004. The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. Trends in Plant Sci. **9** (8): 371-377.

Kirik, A. and Mudgett, M. B. 2009. SOBER1 phospholipase activity suppresses phosphatidic acid accumulation and plant immunity in response to bacterial effector AvrBsT. PNAS. **106** (48): 20532-20537.

Kleppinger-Sparace, K. F., Stahl, R. J. and Sparace, S. A. 1992. Energy requirements for fatty acid and glycerolipid biosynthesis from acetate by isolated pea root plastids. Plant Physiol. **98**: 723-727.

Kondorosi, E., Redondo-Nieto, M. and Kondorosi A. 2005. Ubiquitin-mediated proteolysis. To be in the right place at the right moment during nodule development. Plant Physiol. **137**: 1197-1204.

Kouchi, H., Shimomura, K., Hata, S., Hirota, A., Wu, G. J., Kumagai, H., Tajima, S., Saganuma, N., Suzuki, A., Aoki, T., Hayashi, M., Yokoyama, T., Ohyama, T., Asamizu, E., Kuwata, C., Shibata, D. and Tabata, S. 2004. Large-Scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. DNA Research. **11**: 263-274.

Kusano, T., Tateda, C., Berberich, T. and Takahashi, Y. 2009. Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. Plant Cell Rep. **28**: 1301-1308.

Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., van Brusel, A. A. N. Carlson, R. and Kijne, J. W. 2006. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. Mol Microbiol. **59**: 1704-1713.

Lavery, W. L. and Goyns, M. H. 2002. Increased expression of the S25 ribosomal protein gene occurs during ageing of the rat liver. Gerontology. **48** (6): 369-373.

Leroch, M., Neuhaus, H. E., Kirchberger, S., Zimmermann, S., Melzer, M., Gerhold, J. and Tjaden, J. 2008. Identification of a novel adenine nucleotide transporter in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. Plant Cell. **20**: 438-451.

- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E. P., Ané, J. M., Lauber, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C. and Debelle, F.** 2004. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*. **303**: 1361-1364.
- Li, D., Liu, H., Zhang, H., Wang, X. and Song, F.** 2008. OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress. *J Exp Bot*. **59** (8): 2133-2146.
- Lillig, C. H., Schiffmann, S., Berndt, C., Berken, A., Tischka, R. and Schwenn, J. D.** 2001. Molecular and catalytic properties of *Arabidopsis thaliana* adenylyl sulfate (APS)-kinase. *Arch Biochem Biophys*. **392** (2): 303-310.
- Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Bisseling, T and Geurts, R.** 2005. Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *PNAS*. **102** (29): 10375-80.
- Linder, P. and Owttrim, G. W.** 2009. Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. *Trends Plant Sci*. **14** (6): 344-352.
- Linke, C., Conrath, U., Jeblick, W., Betsche, T., Mahn, A., Düring, K. and Neuhaus, H. E.** 2002. Inhibition of the plastidic ATP/ADP transporter protein primes potato tubers for augmented elicitation of defense responses and enhances their resistance against *Erwinia carotovora*. *Plant Physiol*. **129**: 1607-1615.
- Lohar, D. P., Sharopova, N., Endre, G., Peñuela, S., Samac, D., Town, C., Silverstein, K. A. T. and VandenBosch, K. A.** 2006. Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*. **140**: 221-234.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwaiska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J.** 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*. **425** (6958): 637-640.
- Maekawa, T., Hayashi, M. and Murooka, Y.** 2005. Root hair abundant genes LjH101 and LjH102 encode peroxidase and xyloglucan endotransglycosylase in *Lotus japonicus*. *J Biosci Bioeng*. **99**: 84-86.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Dewbre, G. R., Blaylock, L. and Harrison, M. J.** 2005. Expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, *Mt-XTH1*, from *Medicago truncatula* is induced systemically in mycorrhizal roots. *Gene*. **345**: 191-197.
- Martinez, E.** 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol*. **50**: 925-947.

- Matvienko, M., van de Sande, K., Yang, W. C., van Kammen, A., Bisseling, T. and Franssen, H.** 1994. Comparison of soybean and pea ENOD40 cDNA clones representing genes expressed during both early and late stages of nodule development. *Plant Mol Biol.* **26** (1): 487-493.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A. E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A. and Kondorosi, E.** 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *PNAS.* **103** (13): 5230-5235.
- Meschini, E. P., Blanco, F. A., Zanetti, M. E., Beker, M. P., Küster, H., Pühler, A. and Aguilar, O. M.** 2008. Host genes involved in nodulation preference in common bean (*Phaseolus vulgaris*)-*Rhizobium etli* symbiosis revealed by suppressive subtractive hybridization. *MPMI.* **21** (4): 459-468.
- Mingam, A., Toffano-Nioche, C., Brunaud, V., Boudet, N., Kreis, M. and Lecharny, A.** 2004. DEAD-box helicases in *Arabidopsis thaliana*: establishing a link between quantitative expression, gene structure and evolution of a family of genes. *Plant Biotechnol J.* **2**: 401-415.
- Mitchell, D. A., Vasudevan, A., Linder, M. E. and Deschenes, R. J.** 2006. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein *S*-acyltransferases. *J Lipid Res.* **47**: 1118-1127.
- Mitra, R. M., Gleason, C. A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. D. and Long, S. R.** 2004a. A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: *PNAS.* **101** (13): 4701-4705.
- Mitra, R. M., Shaw, S. L. and Long, S. R.** 2004b. Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *PNAS.* **101** (27): 10217-10222.
- Mitsuhara, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y. and Ohashi, Y.** 2008. Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds. *Mol Genet Genomics.* **279**: 415-427.
- Miyahara, A., Hirani, T. A., Oakes, M., Kereszt, A., Kobe, B., Djordjevic, M. A. and Gresshoff, P. M.** 2008. Soybean nodule autoregulation receptor kinase phosphorylates two kinase-associated protein phosphatases *in vitro*. *JBC.* **283** (37): 25381-25391.
- Mugford, S. G., Yoshimoto, N., Reichelt, M., Wirtz, M., Hill, L., Mugford, S. T., Nakazato, Y., Noji, M., Takahashi, H., Kramell, R., Gigolashvili, T., Flügge, U. I., Wasternack, C., Gershenzon, J., Hell, R., Saito, K. and Kopriva, S.** 2009. Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites. *Plant Cell.* **21**: 910-927.

Nair, R. B., Bastress, K. L., Ruegger, M. O., Denault, J. W. and Chapple, C. 2004. The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell*. **16** (2): 544-554.

Nagano, N., Orengo, C. A. and Thornton, J. M. 2002. One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol*. **321**: 741-765.

Nikolau, B. J., Ohlrogge, J. B. and Wurtele, E. S. 2003. Plant biotin-containing carboxylases. *Arch Biochem Biophys*. **414**: 211-222.

Nishitani, K. and Tominaga, R. 1992. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J Biol Chem*. **267**: 21058-21064.

Osuna, D., Gálvez-Valdivieso, G., Piedras, P., Pineda, M. and Aguilar, M. 2001. Cloning, characterization and mRNA expression analysis of *PVAS1*, a type I asparagine synthetase gene from *Phaseolus vulgaris*. *Planta*. **213**: 402-410.

Osuna, D., Gálvez, G., Pineda, M. and Aguilar, M. 1999. RT-PCR cloning, characterization and mRNA expression analysis of a cDNA encoding a type II asparagine synthetase in common bean. *Biochim Biophys Acta*. **1445**: 75-85.

Park, S. and Buttery, B. 1994. Inheritance of non-nodulation and ineffective nodulation mutants in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Hered*. **85**: 1-3.

Parra-Peralbo, E., Pineda, M. and Aguilar, M. 2009. PVAS3, a class-II ubiquitous asparagine synthetase from the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Biol Rep*. **36**: 2249-2258.

Pedalino, M. Giller, K. and Kipe-Nolt, J. 1992. Genetic and physiological characterization of the non-nodulating mutant of *Phaseolus vulgaris* L.-NOD125. *J Exp Bot*. **43**: 843-849.

Peiter, E., Sun, J., Heckmann, A. B., Venkateshwaran, M., Riely, B. K. Otegui, M. S., Edwards, A., Freshour, G., Hahn, M. G., Cook, D. R., Sanders, D., Oldroyd, G. E. D., Downie, J. A. and Ané, J. M. 2007. The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol*. **145**: 192-203.

Perlick, A. M., Albus, U., Stavridis, T., Fruhling, M., Kuster, H. and Puhler, A. 1996. The *Vicia faba* lipoxygenase gene VfLOX1 is expressed in the root nodule parenchyma. *MPMI*. **9**: 860-863.

Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev*. **64** (1): 180-201.

Polgár, L. 2002. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci*. **59**: 349-362.

- Porta, H., Figueroa-Balderas, R. E. and Rocha-Sosa, M.** 2008. Wounding and pathogen infection induce a chloroplast-targeted lipoxygenase in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta*. **227**: 363-373.
- Porta, H. and Rocha-Sosa, M.** 2000. A *Phaseolus vulgaris* lipoxygenase gene expressed in nodules and in *Rhizobium tropici* inoculated roots. *Biochim Biophys Acta*. **1517**: 139-142.
- Porta, H. and Rocha-Sosa, M.** 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol*. **130**: 15-21.
- Porta, H., Rueda-Benitez, P., Campos, F., Colmenero-Flores, J. M., Colorado, J. M., Carmona, M. J., Covarrubias, A. A. and Rocha-Sosa, M.** 1999. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*P. vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant Cell Physiol*. **40** (8): 850-858.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grenlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. and Stougaard, J.** 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*. **425** (6958): 585-592.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J. and Barrett, A. J.** 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. **36**: D320-D325.
- Reichow, S. L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A. R. and Varani, G.** 2007. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res*. **35** (5): 1452-1464.
- Reiser, J., Linka, N., Lemke, L., Jeblick, W. and Neuhaus, H. E.** 2004. Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **136**: 3524-3536.
- Riely, B. K., Lougnon, G., Ané, J. M. and Cook, D. R.** 2007. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant Journal*. **49**: 208-216.
- Saalbach, G., Pinar, E. and Wienkoop, S.** 2002. Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes. *Proteomics*. **2**: 325-337.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning*. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor.
- Sánchez, M. de la P., Caro, E., Desvoyes, B., Ramirez-Parra, E. and Gutierrez, C.** 2008. Chromatin dynamics during the plant cell cycle. *Semin Cell Dev Biol*. **19**: 537-546.
- Sánchez-Ballesta, M. T., Lluch, Y., Gosalbes, M. J., Zacarias, L., Granell, A. and Lafuente, M. T.** 2003. A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta*. **218** (1): 65-70.

- Sävenstrand, H., Brosche M. and Strid, A.** 2002. Regulation of gene expression by low levels of ultraviolet-B radiation in *Pisum sativum*: isolation of novel genes by suppression subtractive hybridisation. *Plant Cell Physiol.* **43** (4): 402-410.
- Schröder, K., Martoglio, B., Hofmann, M., Hölscher, C., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A. and Dobberstein, B.** 1999. Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4. *EMBO J.* **18** (17): 4804-4815.
- Schubert, K. R.** 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol.* **37**: 539-574.
- Seifert, G. J. and Roberts, K.** 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol.* **58**: 137-161.
- Shibuya, M., Hoshino, M., Katsube, Y., Hayashi, H., Kushiro, T. and Ebizuka, Y.** 2006. Identification of β -amyrin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay. *FEBS J.* **273**: 948-959.
- Shimoda, Y., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Sato, S., Kato, T., Tabata, S, Higashi, S. and Uchiumi, T.** 2005. Symbiotic *Rhizobium* and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* **46** (1): 99-107.
- Sieberer, B. J., Timmers, A. C. J. and Emons, A. M. C.** 2005. Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *MPMI.* **18** (11): 1195-1204.
- Silvente, S., Camas, A. and Lara, M.** 2003. Molecular cloning of the cDNA encoding aspartate aminotransferase from bean root nodules and determination of its role in nodule nitrogen. *J Exp Bot.* **54** (387): 1545-1551.
- Silvente, S., Reddy, P. M., Khandual, S., Blanco, L., Alvarado-Affantranger, X., Sanchez, F. and Lara-Flores, M.** 2008. Evidence for sugar signalling in the regulation of asparagine synthetase gene expressed in *Phaseolus vulgaris* roots and nodules. *J Exp Bot.* **59** (6): 1279-1294.
- Smit, G., Kijne, J. W. and Lugtenberg, B. J.** 1987. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca^{2+} -dependent adhesion in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J Bacteriol.* **169**: 4294-4301.
- Smit, G., Logman, T. J. J., Boerrigter, E. T. I., Kijne, J. W. and Lugtenberg, B. J. J.** 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca^{2+} -dependent adhesion, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. *J Bacteriol.* **171**: 4054-4062.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle F., Gough, C., Bisseling, T. and Geurts, R.** 2005. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor induced transcription. *Science.* **308**: 1789-1791.

- Smit, G., Tubbing, D., Kijne, J. and Lugtenberg, B.** 1991. Role of Ca²⁺ in the activity of rhicadhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* which mediates the first step in attachment of *Rhizobiaceae* cells to plant root hair tips. Arch Microbiol. **155**: 278-283.
- Soclum, R. D.** 2005. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. Plant Physiol Biochem. **43**: 729-745.
- Sprent, J.** 1994. Evolution and diversity in the Legume-*Rhizobium* symbiosis: chaos theory? Plant and Soil. **161**: 1-10.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K. and Parniske, M.** 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. Nature. **417**: 959-961.
- Subramanian, S., Cho, U. H., Keyes, C. and Yu, O.** 2009. Distinct changes in soybean xylem sap proteome in response to pathogenic and symbiotic microbe interactions. BMC Plant Biol. **9**: 119.
- Sugiyama, A., Shitan, N., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S. and Yazaki, K.** 2006. Genome-wide analysis of ATP-binding cassette (ABC) proteins in a model legume plant, *Lotus japonicus*: comparison with *Arabidopsis* ABC protein family. DNA Research. **13**: 205-228.
- Sugiyama, A., Shitan, N. and Yazaki, K.** 2007. Involvement of a soybean ATP-binding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoid in legume-*Rhizobium* symbiosis. Plant Physiol. **144**: 2000-2008.
- Sun, Y. and MacRae, T. H.** 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. Cell Mol Life Sci. **62**: 2460-2476.
- Sun, W., Van Montagu, M. and Verbruggen, N.** 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. Biochim Biophys Acta. **1577**: 1-9.
- Szybiak-Strozycka, U., Lescure, N., Cullimore, J. V. and Gamas P.** 1995. A cDNA encoding a PR-1 like protein in the model legume *Medicago truncatula*. Plant Physiol. **107**: 273-274.
- Taté, R., Patriarca, E. J., Riccio, A., Defz, R. and Iaccarino, M.** 1994. Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. MPMI. **7** (5): 582-589.
- Theodoulou, F. L.** 2000. Plant ABC transporters. Biochim Biophys Acta. **1465**: 79-103.
- Udvardi, M. K. and Day, D. A.** 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. **48**: 493-523.
- Udvardi, M. K. and Scheible, W. R.** 2005. GRAS genes and the symbiotic green revolution. Science. **308**: 1749-1750.

- van Loon, L. C., Rep, M. and Pieterse, C. M. J.** 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* **44**: 135-62.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. and Truchet, G.** 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol.* **172**: 4295-4303.
- Vassileva, V. N., Kouchi, H. and Ridge, R. W.** 2005. Microtubule dynamics in living roots hairs: transient slowing by lipochitin oligosaccharide nodulation signals. *Plant Cell.* **17**: 1777-1787.
- Verma, D. P. S.** 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell.* **4**: 373-382.
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. J., Yazaki, K. and Theodoulou, F. L.** 2008. Plant ABC proteins-a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Sci.* **13** (4): 151-159.
- Vierstra, R. D.** 2009. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature.* **10**: 385-397.
- Vilardell, J. and Warner, J. R.** 1997. Ribosomal protein L32 of a *Saccharomyces cerevisiae* influences both the splicing of its own transcript and the processing of rRNA. *Mol Cell Biol.* **17** (4): 1959-1956.
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A. and Gruppen, H.** 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* **68**: 275-297.
- Vissenberg, K., Fry, S. C. and Verbelen, J.** 2001. Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **127**: 1125-1135.
- Vissenberg, K., Martinez-Vilchez, I. M., Verbelen, J. P., Miller, J. G. and Fry, S. C.** 2000. In vivo co-localisation of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* **12**: 1229-1237.
- Wais, R. J., Galera, C., Oldroyd, C., Catoira, R., Penmetsa, R. V., Cook, D., Gough, C., Dénarié, J. and Long, S. R.** 2000. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *PNAS.* **97** (24): 13407-13412.
- Wandrey, M., Trevaskis, B., Brewin, N. and Udvardi, M. K.** 2004. Molecular and cell biology of a family of voltage-dependent anion channel porins in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **134**: 182-193.
- Watt, G., Leoff, C., Harper, A. D. and Bar-Peled, M.** 2004. A bifunctional 3,5-epimerase/4-keto reductase for nucleotide-rhamnose synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**: 1337-1346.

Wierenga, R. K. 2001. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters*. **492**: 193-198.

Wisniewski, J. P., Gardner, C. D. and Brewin, N. J. 1999. Isolation of lipoxygenase cDNA clones from pea nodule mRNA. *Plant Mol Biol*. **39**: 775-783.

Yamaguchi, A., Hori, O., Stern, D. M., Hartmann, E., Ogawa, S. and Tohyama, M. 1999. Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol*. **147** (6): 1195-1204.

Yang, W. C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H. and Bisseling, T. 1994. *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell*. **6**: 1415-1426.

Yoshida, S. and Parniske, M. 2005. Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *J Biol Chem*. **280** (10): 9203-9209.

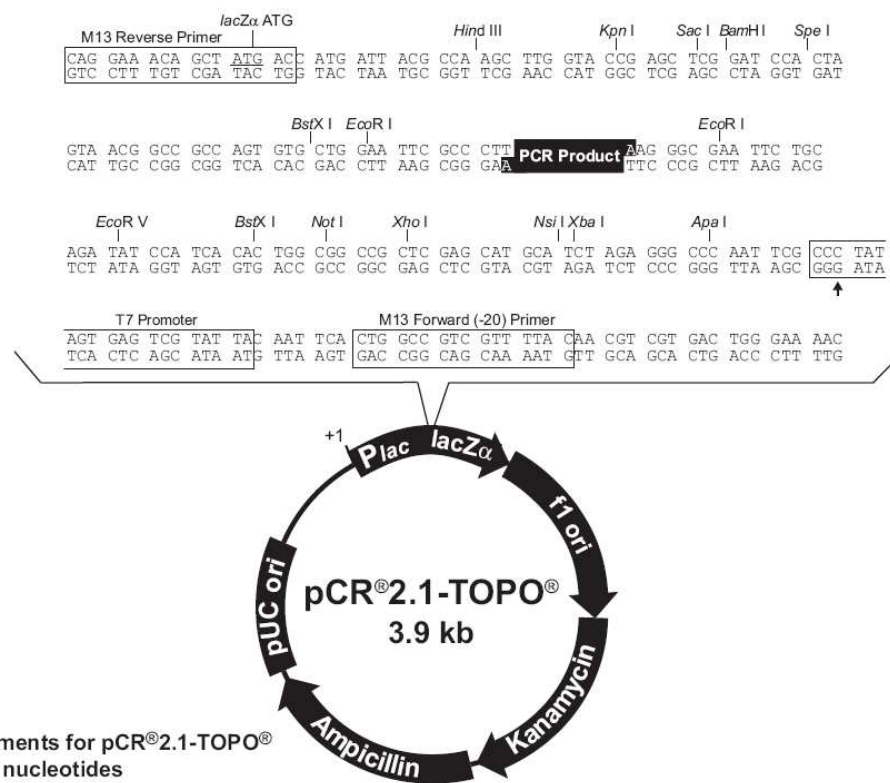
Zanelli, C. F. and Valentini, S. R. 2007. Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids*. **33** (2): 351-8.

Zeng, L. R., Vega-Sánchez, M. E., Zhu, T. and Wang, G. L. 2006. Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Research*. **16**: 413-426.

APÉNDICE

Mapa del pCR 2.1-TOPO

Se muestran las características del pCR 2.1-TOPO y la secuencia que rodea al sitio de clonación TOPO. Los sitios de restricción están marcados para indicar el sitio de corte. La flecha indica el inicio de la transcripción para la polimerasa T7.



Tomada del manual para usuarios: TOPO TA Cloning[®] Versión U, 10/abril/2006, Invitrogen, USA.

Oligonucleótidos utilizados.

Para PCR en colonia:

M13 <i>forward</i> (5'-3')	GTAAAAACGACGGCCAG
M13 <i>reverse</i> (5'-3')	CAGGAAACAGCTATGAC

Secuencia y tamaño de los EST.

Pv-sshfwdtc-02 (198 pb).

ACGCGGGGAC TTGTTGAATT GCAATCCTCT TTCAAAAGGG TATTCGGATT TGGTTTCAAG TTTTCATCTT TCAACTACGC
AACCATGTCT CTCCCCTATC CCTCTCACCT TCTATCTGCT ACTGCTTCTT CTCGTTTCCA ACCCTTGATC CTCAACAACA
CCGTCTCAAT CGAACCTCCC TTTCTGGGTT TCAAGGGT

Pv-sshfwdtc-04 (393 pb).

ACGCGGGGGC ATCAGTGAGT GGAAGCAGCT GGCTATAGTT AGTGTGCAGT TCAAGAACTT GTTTTCATTA GTGTTGTTAG
TTCCTTAGCT ATAGTGAGCT TCATGGCACA CAAAACCATC ATGTTAACCT TTCTTTTCTT CCTTGTCTG CAACACGACT
TTGTGTTATT GACAGCATCA AGGAAGAACA TTCAGATTCA GGCACCACCA GCTATACCTA GGACTCCACA ACATCTGCAG
TGGCACACCA CCAATAAGGA GGGTGCTAGT GGTGATGCTT TCCGCCCTAC GAGCCCTGGT CATAGCCCTG GTGCAGGGCA
TGAGACACCA CCGACTAAAG CGTAGTTTCT TTAGGGTTTT GGTTTTGAAG CTTTTGTTC TTCTTGTTC AGT

Pv-sshfwdtc-05 (685 pb).

ACCTAACCCAC ATCATATATC TGTGCATAAT CTAGACAACA GTAAGAGTGT GTGTGCAACT TGACCTTCTC TTCTCCCTCT
TTTCCAGTCA GTTGAACATC AACTGTAGCA GCTGTAGCAG CACTATACAA TTTTGCTCCT TTTGCTGTCT CTCTCCTATA
TTCTCGAGTA ATGATCTTCT CCTCTTCGAA AAACCCGAGA GTTCGGCGAA GTTGTGTTGT GTGTAATTTG AGATCTTTTG
CCAAATCCTC TTCTCTGACC CATTGTCGCC TTGTGAGGGC ATCAAGAATC ACTACAGCGA TTCTCTGTG ATCACTCCTT
CCCGATTGG GTTGAATCTC TCCTTTACTC GTTAGATCAT CGTAAAAAGC CCTCGCAGCT AGTTTAAACCA ACTTGTGTA
GTGATCAACC ATCGAAGCGA TCTGAGAAAA AAAATTTAAG TGGCTTCGAT GGTTCCTCAG CGTTCAAATC GGAAAGAAAG
GATAAGTGAT GTGCGTGTGT GTGCGATTAT CCAATGATGT TCATCGCAGC TCACAACCTC CTTCATCAT TCTGAACACA
TCCCCCGCT ACCTCGGCCG CGACCACGCT ATCAAGGGAA TAACCGCAGA AAAGAAAAA TGGTGGAGCC AAAAGTAGCA
AAGCCAGGAA TCCGCCTAAA AAGGCCGCCG TGTCTTGTGT GCGGC

Pv-sshfwdtc-07 (286 pb).

ACAATGCAAG GCCGGTTTAT GACAGTTACG GTGGTGGCAG GCCCTGTTAC GTGAACAACC GCTGTGACCA ATATTTACG
GATGAAAACC CTTCAGGCTG CGCAATTATG TGATTACATT ATTGGATCTG TAAATGATGA TGCCCTTTCA CGTCGCTCAA
CTTCATCCAT TTGAACTAT TCTTTGTTT CCTTATTTAA AATTCAAAAG GTGTTATAT TAGAGGAAAA ATAAGGGTTA
TATAATCAA CGTTATAAAT GATATACTAC AAATATGTTT TGTTGT

Pv-sshfwdtc-08 (553 pb).

TCGAGCGGCC GCCCGGGCAG GTACGGGGGT AGCGGGTATA GTTTAGTGGT AAAAGTGCGA TTCGTTTCAT GGACCCCTAA
AAAGTTAAGG GATCCCCCGT TTGATTCATA TFCCGATCAA AAACCTTAT TTTTACTTAA AGGGACTCCT TTATACCCCT
CGATGAATGA TTTGCGGTAT AATATACATT ATTGTAATTT GTATAACAAGA AGAATCAAAT CTAATTTGAC AAATTGAGTT
CTCAAATAT GAAACATAAG TTTTGGAAAT TGGATCTAGA ATCCGAATTT TTTGAGTATT ACTAAAGGAT CTATGGAGAG
AAATATACAA AGTTTCTTTC TAATCGTAAC TAAATCTTCC ATTTTTTTGC ATAGTAGAAA TTGAAGCTAA ATAGCTATTA
AACGATCTT TTAGTTTACT AGAGACATCG ACATTTTTTT AGCTCGATGG AAATTTTATT ACTTTCCTAA AGATTTTCTG
GAATAGAAAT AGAGAACGAA GTAACATAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AGTACCTCGG CCGCGACCAC GCT

Pv-sshfwdtc-13 (540 pb).

GATTCGGGGG AAGATCATT CCCTTGTGTT GTCCTCTGAG AGTTGAAAT CCCCCTAAAT TCATCCGTCA TTGATGGATT
TATTTATCTT TTTTFTTTGA TGAAGATTGG AGTGTATAAA AATTCTGATC AATACTATTT ATTCTGATAG CTAGGGTTTA
AGCACATCAT ACTTTACTTC TGAAGGTTAA CAAAGGTAGG TTGAAAGGTA ATGACAAACA GTATCTCTCT TTATAAAAGG
AACAGTTCTT TAAATACTGT ATGATCAGGA TGATTTTCAT ACTCCTGAAC AACTTCTATG TTGCCAAAGG TTGATTCACA
CATTTATTTG TAACCTTCAT GCACGAGTAT GCTAACTTTT GGACCATCAT CTTTCCCCC GGGAAATGAGT TCATGGCAGG
GAAGACATCT ACTATTTTGT ATAATCTGTT AAAGCCTCTT TAATCTTCTC CGAATGGCCC CCTCCTTGAA CTTTGCCAAC
ACCTTAAATC TCACCTCCCT CTTTGTTCCT GCCATTTCTT CTGTTTTTTC ACCCCCACGT

Pv-sshfwdtc-14 (632 pb).

GGTTTTATGG GTGCATCTGT GGGAGCACGG AACCCCTAGTA AGGGCCGCCC GTGTGCTGGA TTCGCCCTTA GCGTGGTCGC
GGCCGAGGTA CAACAACCTT TTGCTATTGG AGGATCTGGC TCCAGTTACT TGTATGGTTT TTTTGACCAA GCCTGGAAAG
AGGGAATGAC CAAGGATGAA GCTGAGGATT TAGTTAAAAA GGCAGTTTCA CTCGCTATFG CTCGTGATGG TGCAAGTGGT
GGGGTGGTCC GAACAGTCAT AATAAACTCA GAGGGAGTGA CCAGGAATTT CTACCCCTGGC GACCAACTTC CTTTATGGCA
TGAGGAAATG GAGGCTCACA ATTCTTTGCT TGACATCTTT GGTGCCCCCG AGCCGATGAG CATGTGAAGA AGCTACCGTG
TTTCTGAATG GATCCCGGAT AGATTATATC TTGCCATCTC TCTTTTATAA ACTGTTTAAC GATTTGTGTA GTTGCTTACT
TTGGTTGGAT ATTTGTTTTA TCGGGTTTTA TTCTTGAGTT ATGTACCTGC CCGGGCCGCC GCTCGGACGT GATTTCACAC
GATTCTTATA GTGGACTCTT GTTCAAAACT GACAACATCA ACTATCTCCG GCCTATTCTT TTGGAATTA TA

Pv-sshfwdtc-19 (186 pb).

ACTCTTTCCA CCACCACTTG GACCAACAAG AGCAACCTTT GATCCTGGAT TCAGTTTCAA TGTAATGCC TTAGCAGCTG
GATGACTAGG GCGTGATGGA TAGGCAAACC ACACATCATC TAGTCTACT TCCCCATCTT GATCACCCAG CGGACATTTA
CTTCTGACT TGGGCATGGA TGAGGT

Pv-sshfwdtc-17 (699 pb).

AGCGGGGTCG CGGCCGAGGT ACTCAACCTT GAATTGGAAA ACCCCATAGA CATCTGGAAC CTTAAATGAT GTGAAGTAAC
GGCCCTTCCC ATTAGTTGAT AAAGTCTTCG AGACATAGGG GCTCATCATG TAAAATTGCA CTTGAACATC ATCAGCTACG
TAAGGCTCCC AAGATGTCCC AGACCACTCG AAAAATTCAA CAGAGAATTC CAAATCATCA TTGATCTTAT AGATGGCTGG
TTCATTAGCT TCCCCAACTT TGTGATGTTG CATGTGGACT GCCTTGAGGT GACCTCTTTC ATGGAACCATT CATTGCTAA
GTTCACTGAA GAACCTGCTA TTACCTGACT TTTCATGCTT GGTGGACTC CCAGCCTTCT GCACACCTGA CCTGAAAAAT
CGGTTGCTGA ACATGCTCAG TGAGCCAGAG ATCAATATCC GGGCATTATT TCTTGCCTGT ATAAGTAAA CTAACGAGAT
CGAAGATCCA GTGAGTGACG GAGGACTTGT CAGTTTAGAT TTTGGGTTAG CAGAAAAAGC TGAAGGAGAT GCAGAGAGTG
CTTTCAACAC CAGGCTGCTA CGTTCGTAGC ATTTGCCCGT TCAGCATCAA AATGCTGGTC TCACGTCTGA CGTCTGAAGT
TAGTGCCTGT TACCGGCAAG CGTCGGAGCC CTCTCAATAA ATATATATGA AGATCCATG

Pv-sshfwdtc-21 (969 pb).

ACTGGCCTCC AAGGTTTTCT GGTTTTTAAT GCTGTCGGTG GGGCACTGG CTCTGGTCTT GGTTCCTTC TGTGGAACG
GCTTTCTGTG GACTATGGCA AGAAGTCAA GCTTGGTTTC ACTGTCTATC CTTACCCCA AGTTTCAACC TCTGTTGTTG
AGCCTTACAA CAGTGTCTC TCACCCATT CCCTTCTCGA GCACACTGAT GTGGCTGTCC TGCTTGACAA TGAAGCCATT
TATGACATAT GCAGGCGTTC CCTTGATATT GAGAGACCTA CCTACACTAA CCTGAATCGT TTAGTTTCTC AGGTGATATC
CTCACTGACT GCTTCCCTGA GGTTTGATGG TGCCTTGAAC GTTGATGTTA ATGAATTCOA GACTAATCTA GTGCCATACC
CCAGGATCCA CTTTATGCTT TCCTCTTATG CTCCTGCGAT TTCAGCTGAG AAGGCTCACC ATGAGCAGCT ATCAGTAGGT
GAAATACCA ACAGCGCGTT TGAGCCATCG TCTATGATGG CCAAGTGTGA TCCGCGCCAT GGGAAATATA TGGCTTGCTG
GTAGCAGTGA AATCGGTCAC CATCAACTTG TTAATTTGTT TGGAGGCATC AAAATGAGCC TTCCATTTAG CAGTAGAATG
GAAGGTGAGA ATGTGGGAGG ATGAGTTGGA TGATACATGA GCATTCTCCA TGCTCGATAA GTTGCCACCC ATCTTAACGA
AACACCAAC AGTCTAGTTA GAAGAGATTT TGCTTCTTAC TTGTTGGAT CCCCCTGTA CCTCGGCCG GACCACGCTA
ACCATTGCGG TTACCCACCT TTAATTCGCC GTTGACGAC AATCCCCCTT TCGGCCAGCC TTGTGCGTAT TATTGGCGCA
AGAAACCAC

Pv-sshfwdtc-22 (452 pb).

GTTGGTTGTC TCGGAAATTC GCCTTAGCG TGGTCGCGGC CGAGGTACGC GGGGATGATA AAAATATCTA GGAACGCTTC
ATCTTCAAAG CTTACTAATT TTACAGAAGC GATGATGCTT CTTACGAGCA CAGTGATATG TAGAATTCTA TTTGGGAGAA
GCTATGAAGA TGACGCAGCG GAGGGGAGTA GGTTCATTC ACTACTCAA GGTGTCAAG AGATGATGGT TGCATTCTTT
TTCTCTGATT TCATTCTTTC CTTGGGTTGG ATCGATACTG TAACTGGAAA GAAAGCTCGT CTTCTGTACCT GCCCGGCGG
CCGCTCGACA AAATCAAGGC GCAGGCTGCT AAAGGAGCGA CACGTAAAGC AGGTGCGCAG AACGGTGTCT ACTCCACGAT
CATTTCAGCT ACTGGCTACT GTAAGGAACG CCAGCGCCAA GAAGCCAGGG TG

Pv-sshfwdtc-29 (442 pb).

ACCTATTAAG GAATCACTTG TAACAGAGGA GGTGATAGC AGGGACACAA TAACCAGAAA AAGGCCTCAA GCACAAGGAG
GTGATGATTC TAAGAAAAGT TTGAGTGCAG GTAACAGTTT GGAGCAGAGA AATCACAGAA TTATTAAGCC AGAATTTAAA
GCATCTGTTT AACAGCTTGC TTCTCGTGCT GCTTCTAGAG CCATGGCTGA AGCTGCCAAA AACATAACAC CACCAACCAC
TGCGTATGAA TTTGAGGTTCT CTTGGAGAGC ATTTGTCAGGC TATATCTCCC CGTGAATTAC CGAAAATATT CAAAAATGCC
TTATCTTCTA CCATACTTGT TGACATCATC AAGTGTCTTT CATCTTTTTT CACTGAGGAC ATGGATCTGG TTGTCAGTTA
TATGGAGCAT TTGATCAAAG TTCCAAGATT TGACATGATT GT

Pv-sshfwdtc-32 (275 pb).

ACTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTGTGCGAA CCAAATTTG TGATTAAGAA AATAAACAGT AGAAGTAAAT
AAATCAATTT TGTAAGGTTT CTCTAAATGC AAACCTAAGA TAGCTCTTAC TAATGCAGCA CTTAGACTCT ATCAATAATG
AACTTTCACT CATCATCTTC ATCTTCATCG TCCTCACCCAG CAGCGGAGTT GAAAGCTGTC AAGCCAGCAA CCAACTTGGC
CTTCTCTCTC TCATAGGGAA GCTTCTTCAG GTTGT

Pv-sshfwdtc-35 (274 pb).

ACAGTGCCTG GTGAAGCACC GCACGGAGAT ACGGTGCGTT CCCTAGTAAG GGTATTGAGA TGGGAGGACC AGGAGGGAGT
TTCATACCCT GGGATCTTTT GAAGATTGAA CGAATAAAAA CTGTGGAAAT GAACCACAGG AAGAATAGAA CAAGGTAACC
TTTGATGTCT AGCATGGTTG TGCTGTTTAG TTTCTAGGAA CAAACAAAGT TTTTCGAGGT TCACACTACTA GCAACAAACA
AAGTTTCTAG GAGCATGGTT GTGCATCCCC GCGT

Pv-sshfwdtc-37 (425 pb).

ACGCGGGGAT TGGAAAGAGT TTTGTCCAAA CACTGCCTTC TGAATCGTCT TGTCTCCTCT TTTATTGCTC CTGCACACAA
ACATGGCCCG TCTCTCTAAT GGCAACCAAG CTCTCTCTTC CTTC AATACT CCTTCCATCA AGTTCACCAA ACTCTTCATC
AATGGCCAAT TTGTTCATTC TCTTTCAGGG AAAGAATTTG AGACAATAGA TCCAAGGACA GAGGAAGTGA TTGCGAAGAT
CGCAGAAGGA GGAAGGAAG ACACTGATGT TGCTGTGAAA GCGGCACGTG TCCTTTTCGA CCACCGTCCA TGGCCTCGCA
TGCCCGGGCG GGAAGAGCA AGAATTATGA TGAAATGGGC AGACTTAATT GAGCAAAAACA TAGATGAAAT AGCAGCATTG
GAAGCCCTTG ATGCTGGGAA GTTGT

Pv-sshfwdtc-38 (377 pb).

TAGCGTGGTC GCGGCCGAGG TACGTGGATC TGATGGAGAG GCATATCGTG AATCAACTGG GACAATTTCA CCCAGTGATG
GCTCCATCGT CGATCCAGTT TCAGCTGCTG AGGAAATTCG TTTCTGCAAG GCTTGTGCC GGTTTGGTCT TGGCTTGTAT
TTGTATCATG AAGATTGAAG GATCAGATTC CAAGCTTCCA AATTTTGTG TTGGTTGGAT GTGTTGTATT GGTTCCTTCT
CATTGATGTG AATAGAAGTA GACAATAGTT GGAAAACCTCG AAGCCATATC TTTGTTGGTA TGGGGATCCG AATGCTTATG
GGAAATCAAG TTTCTTTTAT TGCTATGCTA AGGTACCTGC CCGGGCGGCC GCTCGAA

Pv-sshfwdtc-43 (574 pb).

ACGCGGGGAG AGACAAAATT TGTGTTGCAC AAAATAGAAT CAATAGATGA GGCCAATTTG GGATACAGCT ACAGCATAGT
TGGAGGTGTT GCCTTGCCAG AACTGCAGA GAAGATCACT TTCGACTCCA AACTCAGTGA TGGTCTAAC GGAGGATCAC
TCATTAAGCT GAGTATAACA TACCACAGCA AAGGAGATGC TCCACCCAAT GAAGATGAAC TCAAAGCTGG AAAAGCCAAG
AGTGATTCTC TTTTCAAGGC CGTAGAGGCA TACCTTCTGG CCAATCCCCTG ATTACAACCTG ATTC AATTGA GTTATCGATA
TCAGTCAGTA ACAAGGTTGC TTATATGATA TACAAGAGTT TTATTTGGCTT GCATATGAAG TGTTATCAAA TCAGAGTGT
CTTAAGTTAA GTTGGCTTCC ATTTTCAGGA GTGTTTTCTT TCTTATTTCC CTTTGTGCA TAATCGTGAG AGCTCGTGAG
TATCTTTGTA TCTTCTTCA TCAATAAATG ATAATAAAGA AAATAATCAC ACTTTAACTT TTCTCGGAAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAA AAGT

Pv-sshfwdtc-45 (389 pb).

ACTTCACCAA AGAATATGAT ATTTATTATG TAAATGAGGA GACTGATGAA CTGGAGTTCT TGATTCCAGA AGAGTCATCG
TTGGAGCAGC ACCTACAGGT TACTGATACT ATGTTTATCA ACTTTATCAG ATACCTACTC TGCATCAACC CCAAAAAAAG
GCCTACTGAG AGACATGCAC TAAAGCATCC ATGGCTTTCC TATGTTTACT AATCCTTTCT CTGGGGGAAA GTTCAGCAAT
TCTATTGGAG TTTTCCACAT CTCATTTACT TTTTCTGCAT ATAGCAAAAC TTGCAATCGC AATTTTGGTT
TGTTTTACCA ACACCAAGTG TCACTGTGTC ATTTCTGTAAT TTCTGTTTTT TGCTGTGTA TTTCTTGT

Pv-sshfwdtc-47 (342 pb).

ACGCGGGGAA GGAGAGGAAA GACAGAGTCT CTCTTCTGTG TTCATTCATT CCCATTACTT TCTTCCAACC CAGCAAACT
CTATAAAACC CCTTTCACCA TTGCCATAAC CCACACAATT CCCCTCAGAT TCACACACCC AATCTCTCTT TTCTGATAAG
ACTAGGGAAC TTGTTTGCAA TGCCAACCTCT GAGCAATTCA ACAATATCT TTTGGCAAGA TTGTCAAATA GGAAGGCCTG
AAAGGCAGCA GCTACTTAAC CAAAAGGGAT GTGTTGTATG GATTACTGGA CTCAGCGGAT CAGGAAAAAG CACATTGGCA
TGTTCCCTAA GCAGAGAAGT GT

Pv-sshfwdtc-51 (550 pb).

ACCAAGCAAA TACTTCTCT CATAAACTGC ACCAGCACGC AGGCAAGGAA ATATATAATC TTTAACAAT TCCTCTTCA
AGTCTTTAAC CACTAATTGA CAGGCCCCAC TGGCTTTGGC TTTCTGTTCT AAACCATCCA ATTC'TTTTAT ACCCTGGCCA
ACATCAGCAG TGAAGCAAAC AACTTCACAA CCATAATTCT CTCTCAGCCA TGAACAATG ACTGATGTGT CTAAGCCACC
ACTGTAGGCC AGCACCACCT TATTCAGTTT TCCACGTAGG CCACCACCTT TTATGGTTTC AGAAACTACC TCTGTATCAC
TGCGAGCAGC TGCTTTAATG GCTTGAAGTT TCTTGGCACC AACACTTGT CTTAGCCCCA ATTC'TTTGAA TGACGAAGTC
TTTGCTTCC AAAGCTGATG ATACAGGAGG CGCCCTGTGG GATGTAGTGA GGGAGCAGTT ACAGGGATTG AAGAGGGAGG
AGAAGAAGCT TTCAACTGAG CCATTGTTGC ACAACACTGG TTGAGTGAGT GAAGGGATGA GTGACAGTGT

Pv-sshfwdtc-56 (480 pb).

ACTTCAGCAA GACTCCGAAC TCCAAGCTTG GTGGAAAGAA CTTGTTTCAGG TGGGTCATAG TGATTTGAAA GATAAGCCAT
GGTGGCCAAA GATGCAAAGT CGTGAAAATT TGGTTGAAAT CTCCACTACC CTCATATGGA TAGCTTCAGC TCTTCACGCA
GCTGTTAACT TTGGACAGTA TCCATATGGT GGTTTAATCC TTAACAGGCC AACTATTAGC AGAAGATTCA TGCCCTGAGAA
AGGGTCTGCT GAGTATGCTG CATTGGCTAA GAACCTGAG AAGGAGTTTC TGAAAACTAT TACTGGAAAAG AAGGAGACCC
TTATTGACCT TACAGTCATA GAGATATTGT CAAGGCACGC ATCTGATGAG ATATACCTGG GAGAGAGAGA TGGTGGTGAC
CATTGGACTT CTGATGCAGG GCCATTGGAG GCCTTCAAGA GGTTTGAAAA GAAGCTTGCA GAGATTGAAA AGAAGCTTGT

Pv-sshfwdtc-57 (594 pb).

GGGGTCGGGG GCGGGGGGAC TTTT'TTTTTT TTTT'TTTTTT TTTT'TTTTTT TTTAAAAAG TATGTTTCCT TTTACCCAT
TCAATTAACA TTAAAGTGCA GGAAAAATG AGAAAGGTAT CAAATACAAC TTATTTTATC ATCCAAACGA TGAAACACAT
CGATGCTGAC GGTAGCCCTT TCAGCCGTAA TTTTAAAAAGT TTAAAGCAAA AGATCAAGCA AGCCAACCCAC CTCCAATTCA

ATAACCAGGC TCCTCCAGAA GGAATGATGA AACAGTGGGG CTGCTGAGCG TGCAGGCGGT GCTCAAGGTG GCGGCGCTCG
TGAGGGAGAG CGACGAGGTA GGATAAGATC ATGCCGCCGT AACAGACATG GAAGATGGGA TCGGGGGAAC TGGTTTCGAT
GTACTTGGCG TGAGTAGTTGT CCATGCCACG CTGAATCGCT CTCTTTATGT AACCCAACGA CAGCATAGGT TTCACGTGCT
CTGGAACCTC GTTCAACTTC TTCCCCCTTA TCTCATTGAA GAATCTTCTC AACGCCATTG CTTCCCTCTG CAACAAACCC
TAAGCAAATT TTCCGATTGC AACCCCTCCC GCGT

Pv-sshfwdtc-59 (1128 pb).

CATCGCGGCT GACTTAGATA GTGAGTCGCG GACAACAGAG AGCGGCGTCT CATTTGACAG ATCTAGGCTG GACACATTTT
GTGAGAAAGG AGAGTATCGG GGTGGGCTTC TTTGTCTTTT TTTCCCATC TGGAGAAAAG GGGGTGTGT GCTCACACGC
GCATATTATA GTGGGTAACCT CCCCGGTTT TTTCCCTCCC GCGGGTTTAA AAAACGCGCC CCGGAAATTT TTTTCCCTCC
CCCAAGGGGG GAATGGGCC CCTAAAAAAA ATTCGGGGCC CCGCCCGGG GGGGATTTT CGAAATTTCC CTTTGGGGG
GGGGGGCCGA GGGGAAACAT TTTTCAGTTT TTTTATATAT CTGCATTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTGTTTT
TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT CGAATCAAAC AACTATCTAT TGAATGTATT CAATCCTAGC GTCTAGCTTT
CCACTCATGG CTGCAACCAG CAATTAGCAA CAGCCCTAT GGAATATGGT ACATAACATA CATTCTTCTT CTCTAECTTA
CACATTTCTT TACTAATTA ACGTATTACA CAGTTAATAA ATATATAAAA AGCAACTGAG GCACCTTCTG TCTAGGTAAA
TTGGCTGGTT ATAGAAGTAA TAACATAGAC AAAATGGTTC TCAATTTCAA AGTTCAAACC TCATCATATT CCATTATTGA
CAATTTGCAT CAGTAAACTG TAGACAGGAC ACTAGAACAA CAAAAGGAA AAAGTAACCA TCGTCAGAAC TTTGATGAAT
CAAAGTCACA GAAAGAAGTT CAAGATACAG GTGCGTTTTT CAGAACACTT TTGATTAGAA GCAGCCACCC AACAGACTG
CTTCAATTTT TTCTTGGAC TTTTGGGTTT TTTTGGGTTT AAGAGAGGCC TTCCCTCCCA CTGTTGCGGA AGCATTGAA
CTTGAAAAAA ATGATAAATT AGCATCACTA GCTGAAGATG AAGCTGAGT CTTAGATGCA GAACCAGAAG CCGCGGAATT
GGGATGCTG TTCGGAACCT TGATGCGAGG GATTCTTTT AACGCTGAG CTCCACCCAT CGCTCACGCT GGGTAGCTGC
CCCCGCGT

Pv-sshfwdtc-60 (369 pb).

ACCTTTTTGA AGATAACAGT TTGTGCCTTT GGAAGTGGT CTTGTATATT TCATACCTGA AGGCTCACAT TACAAGGGTT
TGGTGGCAGG ATGCAATCTT GATACTACTC TTGATCACTC TGTGAGTTG TCTCATCTTT CTTCTCCTCC TACTGCTATT
TCATAGTTAT CTTATTTTAA CAAATCAGAC TACCTTTGAA CTTGTAAGGA GAAGACGGAT TCACATCTA AGGGGAATTC
CGGAAAGAGT GCATCCATTC AGTGGAGGAG TTCGAAGAAA TTTTACTACT TTTCTGCTGTG CAAGGAGCAC CGTATACAGA
TTCGAACCTT TGCCTACCC TCAAGAGATA GAGGAAAGAG CAAGGCCGT

Pv-sshfwdtc-61 (510 pb).

ACTTGGAAAG CGATAACATC TCGAATACTG GGAGAATTTG TCAAAAGCAT CACGAGCCTA TCAATTTCAA GTCCCATTC
CGAAGCTGGA GGCATTCCTT ATTCCAAAGC TGTGAGAAAG TCATCATCAA GAGTTACTTC ATATGAGTCA TCTTCTTCTT
CCTCTTCTCT TTTCTCTGCC ATTAACACAT CACAATGTGT GGTATTCTTG CTGTTCTTGG TTGTTCTGAT CACTCTCGAG
CCAAAAGGGC TCGCGTTCTA GAGCTCTCTC GCAGATTGAA GCACCGTGGG CCTGATTGGA GTGGGCTCCA TCAACATGGT
GACTGCTTTT TGGCACATCA ACGTTTAGCC ATTGTAGATC CAGCTTCTGG GGATCAACCT CTCTTCAACG AGGACAAATC
CGTCATTGTC ACGGTAAATG GAGAGATTTA CAACCATGAA GAACCTCAGGA AACAGCTTCC TGGTCACAAG TTCCGAACTG
GAAGTACTG TGATGTTATT GCACACTTGT

Pv-sshfwdtc-62 (674 pb).

ACTTTAGCCA ACATGAAAAT CCCTCATTCC ATAAAAATGGA ATCATGTGCC ACACAGTAAA CAATATTGCA AGGATAAATG
AGGGGCAAAA TAAGCAAATT ATAGAAGGCA GAATTTGGGA ATGCTATAAA ATACAAGTGC TAAAAATTGT GACACAAGAA
TTTTAAAATA GTCCTTGCAA AGTGCAGATA TCCAACACAG TATTTGGTTG CTGCCCCATA TCCACTTAGA AGATACTACA
CTGAACACAG GACTAAGACC AGTCATTGAA GTATGACTGC CTCTGGACTT CTCAATCAA ACTCTGTAGG AGGCTTTAAC
CTTATCAGTC TTTTGATTCT ATCTTTTTCT GTATTTTCCA AATATCCCTT CCATACAATT TCGTCCAAAC AAAGGCAAAT
TCTTCCATAC TTGTCAAGGA AGAGGCGCTC ACTTGGGGGC TTCCACATA CATCTTCCAC CATCTGAGTT ATCACAAGA
TAACCTCTGA CAAGCAAGT TCGTCATACT GGTCCCTGCC CACAACATAG ATGCTGACAT CCCCAGCAC CGTGTATACT
ATATAAATG ACTTGTGGCA AGCAACAAGG AGCTCTTCTG TTTTGACACC CTAAAGATTA TCAGCTCCTA GTTTGACTAA
GAAAGAACGC CAATGTAGGC GCTCCTCAGC AGGT

Pv-sshfwdtc-63 (173 pb).

ACTGCAAAAG CTGTGGAATG GGATGCATCA TGGTCCAAAA ATCTTGACCC TTCTGGTCTG TGTGCGCTTG GTGTCCATGA
AGCTTCATAT GAAGATGTAG TGATACCAA AATTGACCAA CCAAAAAATG GATCACTTTA GAAGCTCCAA TGGATTGTCA
ACAAAAAAG TGT

Pv-sshfwdtc-67 (326 pb).

ACCCTAAAAC TTTAGGTGGA GGGGCAATCT TTAGTGGTTG GATTCCATTC AATTCTTCTA TAGGAGAACA AATTACGCCC
GAGGCAAGC AGACACCCAT ACTGTGGTGC CATGGAATGG TTGATTGAAC GGTATTGTTT GAAGCTGGAC ATGAGGTTCC
CCCCTTCTTT GAAAAAATG GTGTTGGTTG TGAGTTTAA GCTTATCTCT GTCTTGCCCA CTCCATAAAC AATGAGGAGC
TGCGGCATCT CGAGTCATGG ATCAAGGCAC GCCTACAGAG TTCTTACAAA TAGTTATTTT AGCCTGGAAT AATATATAAT
CTAAGT

Pv-sshfwdtc-75 (280 pb).

ACGCGGGAAA CTACAACAAT TCAATAACCC ATTTCAAAT TTTTAGTCTC CTCTTGATGT TGTACTATAA GAGCCTGTGG
TCTCCGGTCT CGTTTGTATC ATCTTCTGGG CCGTAAGAAT CCGCCCTCTT TCTCTTCTG TTTTGTAGCTT TTTCTCGTTG
GTTTCAAGTT ACACCTCTG TCATTTGATC CGCTTTAGAA ATCTTAGGTT TCTGAGATGA GGAAATGGAA TTAGTGCATT
GGGTTTTTGA ATCTTTTCAT CTTTCTTCTC AAAAGATCGT

Pv-sshfwdtc-82 (216 pb).

ACGCGGGGAT CATAGCAAAG TTGAAACACA AAGAAAAATG GATTCTTCTT TGTGGACTTG CCTGATTCTG TTATCACTAG
CTTCTGCTTC CTTTCGCTGC AATCCAAGGA CACCAATTGA TGTGCCATTT GGCAGAAACT ATGTGCCTAC TTGGGCCCTTT
GATCACATCC AATATCTCAA TGGAGGTTCT GAGATTACAG TTCATCTCGA CAATGT

Pv-sshfwdtc-84 (471 pb).

ACCCACCTT TGGACATGGA ATTATCACCA AGCCTTCATC CTTAGCTTGT TCTAGGAATC TCTGGATAGA TCCTGGAAAA
TACACCTGGC CTAAGAGGAT CGAGATGGCC AATGAAGTTG TAGAACTGA TCCATTTGTT TTAGGCGTTT CTACGACATC
ATTTACACTT ACAGAAGCAG GAATAGGAGT AGGAGGAGGT AGAGTTTCGT TTTGTTCCGT CAAATCCCTC ACTATATGCA
GGTGAAACCC AGCAAGTTTT AAATCTATCT CCCCAATTGA ACTCGAGTCA CATAATTTTG TGACGAGGAA TTCCACCTCA
TTAAAAATGG GAATAAGCTG ACTTGTCAAA ACTGAAGATT TTGTCCCTTC AGAACCTTCT TCAGACCTTG TAATAATCTG
GGTCTCTGAC GATGGGGCAT TGGCTGATGC CAAAAACCTA TCTGTCTGCC GTGACATAAC CAAACTAGTG T

Pv-sshfwdtc-86 (297 pb).

ACTGTCCCAT CCCAGGCAAA TCTTCGTCGA CGGGTAAAGG GGTTTTGTCT TCATCGGGTT TGTTTAGCTG CGCGTAAACC
ATATCGTCCC CTTTCAACTC AAATTTGGTT CGGCCTGCTG TCTTGTGAGA ATATCTTCTC TTCTTCACGC TCCTGTGCGG
ACATTTGCCT CCCATTCTTC GCGTTTCACA ACCGTTGGGG TTTTACAGCT CTGATACTAC TTCCCTTGCA ACTTGGAAAT
AGGGTTTTTA CTATGAAGAC GACGATGTAG TGTGAAACCA CAACGCCTCC CCCGCGT

Pv-sshfwdtc-96 (295 pb).

GCGGGGATGA TGCTTGTGAG GAACCATAAC CATGTCGGAC GAGGAACACC ACTTCGAGTC AAAGGCTGAT GCTGGAGCAT
CAAAGACATT TCCCAACAA GCTGGAACCTA TCCGCAAAAA CGGTTACATT GTCATCAAGA ACAGGCCATG CAAGGTTGTG
GAGGTTTCAA CTTTCAAAAC TGGCAAGCAT GGACACGCAA AGTGTCACTT TGTGGAATT GACATCTTCA CAGGAAAAAA
GCTTGAGGAT ATTGTCCAT CTTCCATAA CTGTGATGTT CCTCATGTCA ATCGT

Pv-sshfwdtc-98 (188 pb).

ACGCGGGGAC AGAATCGAAG CCACAGATAA CGAGATCACC TTAGGAGCAG TTGTTTCTGC AAGAGAAGAA GAAAAGGAAA
TGGATATCAG GTTGATGGAT TTGGACTCTC CATTGTTCTC CACTCTGCAC CGAATCATGG ATCTCACGGA GGACGCAGAG
AAGAACTTGA GTGCTCCGAC GCGGGCGT

Pv-sshfwdtc-99 (493 pb).

ACTGGGTGTG GAATGGTGAA GATTACCCCG GAGTTTCCAA TGTATTTGAG CGATTCTGTA GATGGTTTAG ATAAATTTGT
TGGAATGAA GACGATGAGA TCACTGGGTT GGGTGACAAG ACTTCTGAAA CTCGTCAGGG AACACAGTTG CCGCTTTT
CTGGTGCATT CACATCTGCT CAGGTCAGAG ATGTTTTTGA GACTGAAATG GATCAAGACA GCTCCGAAAG AGATGGAAT
AGCACCATAT TTGAGGAGAC GGAGAGCATA TCTGTTGGAG AGGTGATAAA GAGTCCGTG TFCAGTGAGG ACGAGTCATC
GGACAATTCA TTTTGGATTG ATTTGGGTCA GAGTCCATTG GGGTCTGATG GTGTAGGTCA ATCGAGTAAA CACAAGATAG
CTTCCCGCT ACCATCTTTC TGTTCAATG GGAGAGGAA CCAGAAGCAA CCTTACCAA AACCAACATC TAAGATGTAT
GGCAGTCCGA TGT

Pv-sshfwdtc-102 (307 pb).

ACGCGGGGGG TGTGCTTTTT TTTTTTTTCC GAACAACAGA ACCAGAAATC AGTGACTCAA AATCCCCCAA AAAATAAGGT
TTTTCAAGGG AGGGCACTGT GCCAACCCCC GTCAGATCGG GAATCTCCCT CTTTAAACAA TCCACCCTCA TCACCTCCCA
CCGATCCGAT GTCTCCAGCT ATCCCTCGTT TTCTTCCCGT TTCCCTCGCC TCCAGAAATT ATGCCAACGT GCCGGGAGCA
AGGGACAGCA AAGTTAAGGT CCCTTTGGCT TTGTTTGGAG GTTCAGGAAA CTATGCATCT GCTTTGT

Pv-sshfwdtc-105 (389 pb).

CAACTTCTTT TATGGTCTCC AAAAGTGCAA ACTTTCAC CTTCAAATGC TCGTTTACAA CGCCGGTTCT TAAATGGCTA
GCACCTAGCT TTTTCAAAT TGAATCTCTG ACAGTGACTT TACCAGCCTT CCGCAGTTGA ACTGCTGAAT CACAAGTCAT
TATAAAGACA GATATGGCAT GGACCTTGAA CTTGGAGTTT TGCTCCAAAG GAACGGTTGA GTCTCTCAAG AATGAGAACA
GTTTCTGAGT TGATGGAGCA ATCTCAAATA TCTTCAAGAA AAACCTTGAGG CTCAACTCTG CAGAATTTCT CTTCAATACA
CTCCATGATT TCAGCACCAG AGCTTCTTGC TCTTCCGTGA AACATTTTCC CGAGGAGTTC ATGTTGAGT

Pv-sshfwdtc-106 (416 pb).

ACACGACAAT TTGCTGCAAC AATTTCTCAA AGAAGGCCAT GTTCTTAGCC CTGAAATTAT CTTCTTTATA CTCCAATGAT
ATTTCCAGCA AACCGGGGGA GGAACAAAC TATCTTTGAA GAAAACACC TGTGCTTGT ATCACACTAA CAGCATTCTG
CACCAAAAAC CTTATTCAT CGCTTCACCC TCGCAGAGTT CATCACTCCA TTCACCCTCA CAGAGTTTAT CACTCGTTTC
AATCTCTTCC TCCTCCGATT CCTCACTTCT TAGCTCATCA TTCTGGACCA ACGAACTGTT GTCCCTCGTGT TTCAATGACC
CATCCCCACG ATAAAGAAGC CCCGTCTGCA TGACACGGTA GAACCTATCT CTGTGTGCAA CAAGAGGGTG CGGTCAACC
AGTTTTCCAC TCTGGT

Pv-sshfwdtc-108 (458 pb).

ACTATGAAGT TCTTCAATCA AACGGGATGG AACAGTATAC TCAAGAGAAG CACTAGCCTC AGCCTTTTTT ATCAACTTCC
TAAATCGTCC AACCTCATCG TTTGACATCA ATGTGAAGCA ACACCCAGTC TGGCCTGCTC TTGCACTCCT GCCAGCTCGA
TGAACATAAG TCTTTATGTA TTTGGGCATG TCATAATTAA TAACATTTCT TACCCCTTCT ACGTCCATTC CCCTAGTCAT
TGCATCAGAA GATACAAGCA CTTGAAACTG CCCTTTCCGA AACCTATTCA GTGTCTTGTCT TCTTACACGT TGATGTTGAT

GACCAGAATA CTCCTTGATA TCAATTTGCA GATCTCCAAA ATAGTTTAGC AATTTGCATA GACGATGTGT TGAGTCCACA
GACCTTGATA AAACATATGCA TTTTCTTCT CCCAGGGATT TCAAAAGGGC AACCAAGT

Pv-sshfwdtc-111 (265 pb).

ACTCCAGTCA ACTGAAGAAT TTCATGCGCT GAACCTTACT CAAACTATAA GCAGTGCATT CTTTCCACGG TTCAGCCCAG
ATGGAAAAGT TCTTGTGTTT TTATCTGCAA GAAAGTCTGT GGACTCTGGA GTGCACAATG CTACAAATTC ACTTCACAGA
ATTGATTGGC CAACTGATGG AAAACCGTTC CAATCTTCCA AAATTTACGA CATTATCTCT GTTGTGATGT GTGCTGAAGA
TGGTTGCTTC CCTGGGCTTT ATTGT

Pv-sshfwdtc-208 (445 pb).

ACCCAACATG CATTGGATCC ATTGACCACA TTGAAGGCAC GTGTCACCAA CTTTGGTAAG ACAAATGCTC TCATCCAGCA
TGAGTGGCGT CCCAAATCAT TTTTACAAT TTCTGGTGAG GTAGACACCA AGGCCATTGA GAAGAGTGCC AAGGTTGGAT
TGAGTTTGGT TCTCAAACCC TAAGAATTTT TATCCATCCT GGCAAGAGAA TTGAAGTAGG TGTTAGGAAG CTTATAGTCT
GTCAGACTAA ATCATTCTCT TGAAGTTGGT TCTCTTCTTG GGTAAAGAAGT GTTCATGGTG TTTTCTGTTG ATCTGAGCAA
TTCAACTTTG TAAAAATAAA ATAGGTTTTC TATAAACCAA CTGTGACTCT TGAATGCCCC AAGCTCAGCA AGCCTCTTTT
GTTGCTGAAG AACCGTGATA CCTCGGCCG CACCACTCTG GGGGA

Pv-sshfwdtc-211 (131 pb).

ACGATTCCGG TCATCCTCTC GGATCCGGAA TCGGGTTCAA AGAGCACGAC ACTCCCAATT TCACCGGTTT CTTCTACTCT
AAGACCAAGG CCATGGTAGA GGAGCTGCTT AAGAACTACG ATAATGTGTG T

Pv-sshfwdtc-212 (524 pb).

ACGGGCATAG TCAAGAGAGT AAACAATAA AAGGGACGAT GCACCAGCAG CACCTCCAGA GGCCAAGTTA CCAGCAAACC
ACTTCCAGTA GCCATCTCTG TCCTTCTTGA AATTGAAAAG CCTCTTGAAA TAGTCCTTAA ATGCAAAGTT CAAAGCCTGA
GTGGGGAAAT AACGGATGAC ATTTGCAGTG TTTCTCTCTC ATAGAGAAAC AGCACCTCTC TCAGCCATTG TTTCTTTAAA
ACAATCACCA ATACCCTTGT AGGGCTCAGA AAGCCTTCCA GTTTTGTAGCA TTTTATCCTG GTTCTGGATC AGAAGCTTAA
CACGTTCAAT GGGGGCAGCA GCAGTTTTTG AGACAGCTGC TGAACACACT CCCATGAGAA AGTCAATAAG AAAATGCCCT
TTCTCTGCTG GGGCTGCAAC AAATACAGG GATGGTGTG CTACAGCAGC AGATAAATCC ATAGTAGTTT TGCATGAGGG
CATCAATGCA GCATTCGAGT AGTTCCCAA GGAGGGTCTT TGTT

Pv-sshfwdtc-217 (184 pb).

ACTTTGTTTT TGAATACATG GAATGCAACC TATACCAGCT TATGAAAGAT AGGGAAAAAC TGTTTTCTGA AGGTGAAGTT
AGAAATTGGT GTTTTCAAGT TTTCCAAGT CTTGCTTACA TGCACCAGCG TGGATACTTC CATCGTGACC TGAAGCCTGA
AAACTTGCTG GTTACCAAGG ATAT

Pv-sshfwdtc-219 (354 pb).

ACTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT CGGTAAAATT TCATATCGAT AAGGGGATTG CGGCAAAGCC GCAAAATACA
ACAAAAATTA GGGAAAACGG GAGTTGGGAA AAAAGAGGGA GGGAGGGATT GAGGGGAGAA TCAATTGCTC ACAGAGCATA
TGCTAAAACA TCTAAAATAT TCACACGCA GTTATTGAAA CAACCAATAT AAAAAATTC CTTTGTGGT GTATATGAAG
CAAAACCAAT GACTTGTGAG ATTCTACTTC CTTATCCCAT TCACCTGGCA AGTTCGTTGC GGATTTGTTT TGCTGCGGCC
ACCATGTTGG TGAGGGCTGG GTTCACCTCT GTGT

Pv-sshfwdtc-223 (337 pb).

ACCTTTTTC GAAAAGCAGT CAATTCTGTA TGCAATTGAG CATTGTGTTG CAAGGTAACG AGCCATTCTG CCCTTATTTT
GGCAGATGCC CGACCAATAA AAGAAGAGTG GAATATCAA CCATATTTGG GAGTGTTTCC TCTGGTTTTT AATGCCCTGA
ACAAAGCCTT CTCTGCACCA AGAATTTGAA GAGTTGATGA GGGGCACCTA GCTAAAATTG TCAGACTACC AGCATGTGAA
ATCAAACGAG CACCAACAAC TTCCCAATC AAAGAGGCCA AATTTGGTGC AATATCATT CTTTTAGCAA CCAGGTAATC
ATACAGTTT TTTCTGT

Pv-sshfwdtc-224 (320 pb).

ACACAGGAAA TGCTTCTAAG TTATAATCAT GGAGTATGAA AGCTGGACCA GGGAAATTAC TATTTATACG AATACTACAA
AAATACCATC AAGTGGTTGA GGAACCTGCA TTTCTACTC TTTACCATT CTTTTATCAT GTTTTTGTGT TTTCTTTCT
TTGATATGTT GAGATAAGGG CATGAAGGCT GGCAAGATAT GTAAGATTCA ATTTTTCCCC GTTTTGTGTT AGTAGAAGAG
ATGTGCATTG TTACCGTTTT GGTTTGGTTG AATCAACAAA TTCTTTTTAT GAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAAGT

Pv-sshfwdtc-229 (304 pb).

ACGCGGGGAT CCTTCATAAG ATGAAGGTAC CCTTTTGTTC TTTACCTTT CTTGTTATCC TAATCTCTC TTTTATTGCT
ATACTTTAAT CGAATTGCTA CCTGGAAAA GTTTTGGGCC CATCTGATTG TGATTGAGG AAAGGAAAGA GCAAGATGAA
GAAGCACATA ACTCATGGCT TTCACTTGGT AAAGGGGAAGA GCAGGTGATG CCATGGAAGA CTATGTTGTT GCTCAGTTTA
AGCAAGTTGA TAACAATGAA TTGGCTTAT TTGCAATATT CGATGGCCAC TCAGTCCAAA GAGT

Pv-sshfwdtc-231 (307 pb).

ACTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTCTCTAC ATTTCACTCA ACTGATGTTT TTCATTTTTA AATTCAACAG AGAACCCAGT
AACTATGTTT GTTACTAAGC ATAACAAGAA TTCCAAAAA GCAAGTATTT GTGATGTGAC AACACAATTC AAAAGATCAA
CCTCCAAAAC CATAGAGGGT CCTTCCCTGC CTCTTCAGCG CATAACAAC GTCCATGGCC GTAACCGTCT TCCTCTGGC
GTGCTCGCGC TAGGTACACG CGTCGCGAAT CACATTTCTC AAGAATATCT TGAGCACTCC CCGCGTA

Pv-sshfwdtc-233 (314 pb).

ACGCGGGGAC CACCCTTTGG CTTTTCCACT CTGTGTTCTTG GTCCTCCCTG TCCAATTTTC CATGGAAGAG TTCCAAAGAT
CAAGGTCTTA CGCAAATGGG CAAATGATGC AGATTGAGAG CTACTATGGC GCCCCAGCA GGCCCTATGA TCTCAGATGT
TACAGTGCTT CCTATGCTCA AACTCAGATG GGTCCCTAGGG ACTTGAAAGT GAAGAAAAGG AAAAGCATT CTGCAGCCTC
TTCTTTCTCA AAGTCTTTGA CCTTATCTGA TCCTGAGCTT CAGAGGAAGA AGAGGGTTGC CAGCTACAAA ATGT

Pv-sshfwdtc-234 (410 pb).

ACTGATTACC AGCTAATTGA TATATCTGAG GATGGATTG TGAGTCTGCT TACCGAAAAT GGGAACTACTA AGGATGACCT
CAGGCTCCCC ACTGATGACA GTCTGCTGAC TCAGATAAAG GAAGGATTG CGGACGGCAA GGACCTTGTT GTGTCTGTGA
TGTCTGCTAT GGGTGAGGAA CAGATTTGTG CTCTCAAGGA TATTGGGCCG AAGAACTAGC TTTGTATGCC GGCAGTTTGT
TGTTTCTATT TAAGCAAAAA TATTTTTGTA AACTTTGGTT TGTTCAGAC CTGGCTTATA GATTCTAGTC AGACTAGTCT
TAACAATGTT GTTTTTATGT TGTCTGTGA TTTTATTATA AACGAGGAGT ATTGTGGTGG GTAAAAAAA AAAAAAAA
AAAAAAAAGT

Pv-sshfwdtc-237 (382 pb).

ACCTAAGTTG CAGCTAATAT CATGGCTCCA AAGAAGGATA AGGCTCCTCC ACCTTCCTCC AAGCCCGCCA AATCTGGCGG
TGAAAGCAG GAGAAGAAGA AGTGGAGCAA GGGAAAGCAA AAGGAGAAGG TGAATAACAT GGTGCTGTTT GACCAGGGCA
CATATGACAA ACTACTCTCT GAAGCACCCA AATACAAGCT CATCACTCCT TCCATTCTCT CTGATCGTTT GAGGGTTAAT
GGATCACTTG CAAGGAAGGC TATTAGAGAA CTGATGGCTA GAGGTTCAAT CAGGATGGTG TCTGCCCATG CAAGTCAGCA
AATTTACACC AGGGCAACAA ACACCTAAT GCGGAATTGT TCCTAGGTTA TGGAGTACCT GC

Pv-sshfwdtc-238 (512 pb).

ACGCGGGGGC ACATTCACAC ACGCGAGAAA ATAAGTTTGG AGAGGGCGCT GCCGGAGGAA CACCGTCTTT TATTTCCGG
CCATCTCTTG TTTCTTCCAC CACTCGGCGA TCCCGTTTCT CTGACACCAA ACATGACGAC ATCAAGGCGC TTTGCTGACA
GGAAGTGGA GAAGTTTGG AAGAACATTA CCAAAAAGAG ATTTGTGCCG GACACAACCT CTAAAAAGGG AAAAGACTAT
CCTGTTGGTC CACTGCTGCT GGGTTTCTTC GTCTTTGTTG TCATTGGTTC ATCTCTCTTC CAGATTATCA GAACAGCAAC
AAGTGGAGGC ATGGCTTAAT GGAGCATGT TTTGGAATGT ATCATCTTTT CTTTCTTAGC CTCGTAGAAA ATGCCAATAC
TTCCCTACAT CTACTGTACT TGTACCAGC CCGGTTCCGG TTCATGTTTT GATGAGCTTT AATAATTTTT AATTTACATT
ACAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAG TA

Pv-sshfwdtc-240 (250 pb).

ACGAACAATG CCCGAATTGC TGGCATGCTT CGTAATCTTT CAAGTTATTA CTACAAGGAT ACCAGCCTTC TATTTGTGT
GCGGATTGCC CAAGTCTTG TGCAATTTGG AAAGGGCTTA TTAACACTTA ATCCATATCA TTCAGATCGT TTCCTACTAT
CACCAGCAGC GCTTGCTGGA CTAATTACCA TGTTGCACGC TTGCCTAGAT ATGAAAGCCA TTGTGTTGGG GAAATATCAC
TATGTTCTGT

Pv-sshfwdtc-245 (623 pb).

ACCATTGCTC TCGAAGAAGG TCGTGAAGAA GCGCGTGAAG AGGTTTATAC GCCCCAAAG CGATCGCAAG ATCTCCGTCA
AGCCAAGCTG GCGTAGACCC AAGGGTATTT ACTCTCGTGT CAGGAGGAAG TTCAAAAGGAT GTGCTTTGAT GCCCAACATT
GGTTATGCTT CAGACAAGAA AACTCGCCAT TATCTTCCAA ATGGTTTCAA GAAATTTGTT GTGCACAATG CGAAAGACCT
TGAGCTTCTC ATGATGCATA ACAGGACTTA CTGTGCTGAA ATTGCTCACA ATGTATCCAC AAGGAAGAGG AAGGACATTG
TTGAGAGAGC TGCCAGCTT GATGTAGTTG TGACAAACAA AACTGCCAGA CTACGCAGCC AGGAAGATGA ATAGATCCCA
ATGCTGTTGG GACGATTTTA TGTTTTGTAG TGAGCTTTGG TTGACACCCT TATTAGTAGA TTTTGATTTA TTTATGCTAT
TTCCATTGTC AAAACCATTA GTAGGTTTTG ATTGCTTTTT GCTATTTTCA TTGTCAAAC CTTGCTGCAA TGTCATACGT
TTGTTATGTC GCGTAATGTT TACTGTTAAA AATTATTTCA AAAAAAAA AAAAAAAA GGT

Pv-sshfwdtc-246 (319 pb).

ACCAACAAC AAGTTTGGAG CCATATGCAG TGCACACAAC ATTTCAATAT GGAGGAACTG AAGGAAGCG CCATCGACTG
CGAGAAGCCA TGCTTCTCT TGATCCACCA GAATACTATA ATCTCTCTGG GGGATTCTTG TCATTTCAAGC CACATATTCC
AAAAAGCTTG TTGCTAAGTG GGGAGCATAA TGTTGAATCA CATTTTACTC TTGTTAATTA CCAAATTA CAGATTAGGA
CTGCACCTGC AATTGCTTCC CTTTTGAACA GAACACTGGT CATGCCTCCA CTATGGTGCA GGGTTGATAG GCTATGTTA

Niveles de expresión en unidades arbitrarias de los EST.

Niveles de expresión en unidades arbitrarias de los EST expresados antes del tratamiento con los FN (0 h).

EST	Densidad	Densidad	Promedio	Desviación Estándar
	Normalizada I	Normalizada II		
Acuaporina	100	100	100	0
Pv-sshfwdtc-02	190.7738095	179.8679868	185.3208982	7.711581203
Pv-sshfwdtc-04	233.3333333	257.7557756	245.5445545	17.26927452
Pv-sshfwdtc-05	96.72619048	86.79867987	91.76243517	7.019810071
Pv-sshfwdtc-07	38.39285714	45.54455446	41.9687058	5.057013667
Pv-sshfwdtc-08	171.1309524	142.9042904	157.0176214	19.95926408
Pv-sshfwdtc-13	82.73809524	86.79867987	84.76838755	2.871266927
Pv-sshfwdtc-14	57.73809524	55.44554455	56.5918199	1.621078135
Pv-sshfwdtc-17	242.5595238	225.7425743	234.151049	11.89137907
Pv-sshfwdtc-19	146.7261905	157.4257426	152.0759665	7.565725844
Pv-sshfwdtc-21	107.4404762	94.05940594	100.7499411	9.461845513
Pv-sshfwdtc-22	59.82142857	92.40924092	76.11533475	23.0430631
Pv-sshfwdtc-29	63.98809524	75.57755776	69.7828265	8.194987537
Pv-sshfwdtc-32	58.63095238	74.25742574	66.44418906	11.04958528
Pv-sshfwdtc-35	121.4285714	77.22772277	99.3281471	31.25471982
Pv-sshfwdtc-37	201.1904762	148.8448845	175.0176803	37.01392286
Pv-sshfwdtc-38	73.80952381	116.5016502	95.15558699	30.18789205
Pv-sshfwdtc-43	47.32142857	55.11551155	51.21847006	5.511248928
Pv-sshfwdtc-45	184.8214286	175.5775578	180.1994932	6.536403738
Pv-sshfwdtc-47	225.8928571	226.4026403	226.1477487	0.360471102
Pv-sshfwdtc-51	59.22619048	52.47524752	55.850719	4.77363754
Pv-sshfwdtc-56	122.9166667	165.0165017	143.9665842	29.7690788
Pv-sshfwdtc-57	86.9047619	106.6006601	96.75271099	13.92710315
Pv-sshfwdtc-59	164.8809524	150.8250825	157.8530174	9.939000902
Pv-sshfwdtc-60	161.6071429	128.3828383	144.9949906	23.49313106
Pv-sshfwdtc-61	192.5595238	149.1749175	170.8672207	30.67754933
Pv-sshfwdtc-63	41.66666667	55.77557756	48.72112211	9.976506566
Pv-sshfwdtc-65	156.547619	143.5643564	150.0559877	9.180553035
Pv-sshfwdtc-67	52.67857143	57.09570957	54.8871405	3.123388334
Pv-sshfwdtc-75	164.5833333	128.0528053	146.3180693	25.83098411
Pv-sshfwdtc-82	98.80952381	102.970297	100.8899104	2.942110959
Pv-sshfwdtc-84	186.3095238	212.5412541	199.425389	18.54863439
Pv-sshfwdtc-86	86.9047619	94.05940594	90.48208392	5.059097315
Pv-sshfwdtc-93	49.4047619	44.88448845	47.14462518	3.196316013
Pv-sshfwdtc-96	150.5952381	97.68976898	124.1425035	37.40981598
Pv-sshfwdtc-98	158.9285714	106.2706271	132.5995992	37.23478954
Pv-sshfwdtc-99	42.55952381	59.7359736	51.1477487	12.14558412
Pv-sshfwdtc-102	76.19047619	62.70627063	69.44837341	9.534773193

Continuación (0 h).

EST	Densidad Normalizada I	Densidad Normalizada II	Promedio	Desviación Estándar
Pv-sshfwdtc-105	114.5833333	76.56765677	95.57549505	26.88114269
Pv-sshfwdtc-106	46.42857143	45.87458746	46.15157944	0.391725822
Pv-sshfwdtc-108	36.9047619	36.30363036	36.60419613	0.42506419
Pv-sshfwdtc-111	145.2380952	134.6534653	139.9457803	7.484463573
Pv-sshfwdtc-208	368.452381	372.9372937	370.6948373	3.171312238
Pv-sshfwdtc-211	281.25	193.0693069	237.1596535	62.35316604
Pv-sshfwdtc-212	471.4285714	415.1815182	443.3050448	39.77267279
Pv-sshfwdtc-217	335.7142857	382.1782178	358.9462518	32.85496147
Pv-sshfwdtc-219	422.0238095	425.0825083	423.5531589	2.162826611
Pv-sshfwdtc-223	272.9166667	272.2772277	272.5969472	0.452151613
Pv-sshfwdtc-224	402.6785714	407.9207921	405.2996818	3.706809771
Pv-sshfwdtc-231	101.1904762	100	100.5952381	0.841793787
Pv-sshfwdtc-233	447.0238095	496.69967	471.8617397	35.12613778
Pv-sshfwdtc-234	399.4047619	378.8778878	389.1413248	14.51469188
Pv-sshfwdtc-237	331.25	342.2442244	336.7471122	7.774090643
Pv-sshfwdtc-240	396.4285714	450.8250825	423.626827	38.46414186
Pv-sshfwdtc-246	428.5714286	472.9372937	450.7543612	31.37140411

Niveles de expresión en unidades arbitrarias de los EST expresados después de 1h del tratamiento con los FN.

EST	Densidad Normalizada I	Densidad Normalizada II	Promedio	Desviación Estándar
Acuaporina	100	100	100	0
Pv-sshfwdtc-02	184.8238482	290.7563025	237.7900754	74.90555678
Pv-sshfwdtc-04	194.8509485	347.8991597	237.7900754	108.221428
Pv-sshfwdtc-05	104.3360434	117.6470588	110.9915511	9.412309254
Pv-sshfwdtc-07	59.3495935	64.70588235	62.02773792	3.787468168
Pv-sshfwdtc-08	126.8292683	131.372549	129.1009087	3.212584592
Pv-sshfwdtc-13	99.45799458	83.47338936	91.46569197	11.30282275
Pv-sshfwdtc-14	70.46070461	74.22969188	72.34519824	2.665076457
Pv-sshfwdtc-17	242.2764228	230.5322129	236.4043178	8.30441046
Pv-sshfwdtc-19	180.2168022	172.2689076	176.2428549	5.620010168
Pv-sshfwdtc-21	140.6504065	149.2997199	144.9750632	6.115988158
Pv-sshfwdtc-22	73.17073171	141.1764706	107.1736011	48.08731913
Pv-sshfwdtc-29	77.23577236	110.0840336	93.65990299	23.22722827
Pv-sshfwdtc-32	76.69376694	102.2408964	89.46733165	18.06454848
Pv-sshfwdtc-35	110.8401084	152.1008403	131.4704744	29.17574332
Pv-sshfwdtc-37	161.7886179	131.092437	146.4405274	21.70547767
Pv-sshfwdtc-38	103.2520325	73.94957983	88.60080618	20.71996299
Pv-sshfwdtc-43	68.29268293	60.50420168	64.3984423	5.507287907
Pv-sshfwdtc-45	154.200542	163.3053221	158.7529321	6.43805175
Pv-sshfwdtc-47	172.0867209	277.8711485	224.9789347	74.8008861
Pv-sshfwdtc-51	68.83468835	76.75070028	72.79269431	5.597465716
Pv-sshfwdtc-56	104.8780488	171.7086835	138.2933661	47.25639499
Pv-sshfwdtc-57	76.96476965	140.6162465	108.7905081	45.00839091
Pv-sshfwdtc-59	135.2303523	155.1820728	145.2062126	14.10799686
Pv-sshfwdtc-60	131.1653117	147.8991597	139.5322357	11.8326174
Pv-sshfwdtc-61	173.1707317	130.2521008	151.7114163	30.34805495
Pv-sshfwdtc-63	57.72357724	56.58263305	57.15310514	0.806769374
Pv-sshfwdtc-65	152.5745257	136.9747899	144.7746578	11.03067897
Pv-sshfwdtc-67	69.91869919	53.22128852	61.56999385	11.80685231
Pv-sshfwdtc-75	139.8373984	152.3809524	146.1091754	8.869632094
Pv-sshfwdtc-82	122.7642276	136.9747899	129.8695088	10.04838497
Pv-sshfwdtc-84	156.9105691	203.3613445	180.1359568	32.84565828
Pv-sshfwdtc-86	82.38482385	113.4453782	97.915101	21.96312861
Pv-sshfwdtc-93	59.62059621	53.22128852	56.42094236	4.524993862
Pv-sshfwdtc-96	88.07588076	145.3781513	116.727016	40.51882408
Pv-sshfwdtc-98	129.5392954	109.2436975	119.3914964	14.3511549
Pv-sshfwdtc-99	59.89159892	58.82352941	103.6095739	0.755239193
Pv-sshfwdtc-102	83.7398374	71.70868347	77.72426044	8.507310529
Pv-sshfwdtc-105	96.20596206	81.51260504	88.85928355	10.38977239
Pv-sshfwdtc-106	67.75067751	56.30252101	62.02659926	8.095069093

Continuación (1 h FN).

EST	Densidad Normalizada I	Densidad Normalizada II	Promedio	Desviación Estándar
Pv-sshfwdtc-108	58.26558266	51.2605042	54.76304343	4.953338482
Pv-sshfwdtc-111	88.61788618	145.0980392	116.8579627	39.9374992
Pv-sshfwdtc-208	170.4607046	385.9943978	278.2275512	152.405336
Pv-sshfwdtc-211	150.1355014	277.0308123	213.5831568	89.72853484
Pv-sshfwdtc-212	394.8509485	387.67507	391.2630093	5.074112348
Pv-sshfwdtc-213	227.3712737	169.4677871	198.4195304	40.94394803
Pv-sshfwdtc-217	305.9620596	283.4733894	294.7177245	15.9018912
Pv-sshfwdtc-219	300.5420054	294.9579832	297.7499943	3.948499964
Pv-sshfwdtc-223	246.3414634	216.2464986	231.293981	21.28035369
Pv-sshfwdtc-224	341.4634146	360.7843137	351.1238642	13.66193877
Pv-sshfwdtc-231	160.1626016	152.6610644	156.411833	5.304387823
Pv-sshfwdtc-233	353.9295393	416.5266106	385.228075	44.2628136
Pv-sshfwdtc-234	429.2682927	638.9355742	534.1019335	148.2571565
Pv-sshfwdtc-237	291.0569106	351.2605042	321.1587074	42.57036929
Pv-sshfwdtc-240	314.9051491	230.8123249	272.858737	59.46260624
Pv-sshfwdtc-246	356.097561	324.929972	340.5137665	22.03881354

Niveles de expresión en unidades arbitrarias de los EST expresados después de 6 h del tratamiento con los FN.

EST	Densidad Normalizada I	Densidad Normalizada II	Promedio	Desviación Estándar
Acuaporina	100	100	100	0
Pv-sshfwdtc-02	120.9606987	110.4961832	115.7284409	7.399529872
Pv-sshfwdtc-04	208.7336245	187.2137405	197.9736825	15.21685591
Pv-sshfwdtc-05	89.51965066	48.09160305	68.80562685	29.2940534
Pv-sshfwdtc-07	50	36.45038168	43.22519084	9.581026997
Pv-sshfwdtc-08	92.79475983	68.89312977	80.8439448	16.9010047
Pv-sshfwdtc-13	82.09606987	55.72519084	68.91063035	18.64702739
Pv-sshfwdtc-14	53.49344978	44.46564885	48.97954932	6.383619257
Pv-sshfwdtc-17	127.9475983	112.0229008	119.9852495	11.26046159
Pv-sshfwdtc-19	112.2270742	74.61832061	93.42269742	26.5934047
Pv-sshfwdtc-21	83.40611354	34.54198473	58.97404913	34.55215684
Pv-sshfwdtc-22	82.09606987	57.2519084	69.67398913	17.56747505
Pv-sshfwdtc-29	97.81659389	62.02290076	79.91974732	25.30996314
Pv-sshfwdtc-32	89.73799127	55.15267176	72.44533151	24.45551396
Pv-sshfwdtc-35	115.720524	65.26717557	90.49384979	35.67590481
Pv-sshfwdtc-37	163.1004367	72.32824427	117.7143405	64.18563281
Pv-sshfwdtc-38	102.8384279	56.87022901	79.85432848	32.50442515
Pv-sshfwdtc-43	59.38864629	42.7480916	51.06836895	11.76664906
Pv-sshfwdtc-45	151.7467249	100.3816794	126.0642021	36.32057199
Pv-sshfwdtc-47	221.3973799	115.648855	168.5231174	74.77549906
Pv-sshfwdtc-51	75.10917031	56.48854962	65.79885996	13.16676716
Pv-sshfwdtc-56	119.650655	98.47328244	109.0619687	14.97466374
Pv-sshfwdtc-57	103.0567686	78.6259542	90.84136138	17.27519453
Pv-sshfwdtc-59	149.3449782	77.86259542	113.6037868	50.5456776
Pv-sshfwdtc-60	148.0349345	84.16030534	116.0976199	45.16618342
Pv-sshfwdtc-61	114.1921397	64.69465649	89.44339811	35.00000603
Pv-sshfwdtc-63	62.00873362	42.7480916	52.37841261	13.61933058
Pv-sshfwdtc-65	147.1615721	89.69465649	118.4281143	40.63524572
Pv-sshfwdtc-67	58.73362445	40.26717557	49.50040001	13.05775123
Pv-sshfwdtc-75	90.3930131	72.51908397	81.45604853	12.63877649
Pv-sshfwdtc-82	118.3406114	55.34351145	124.5429014	44.54567657
Pv-sshfwdtc-84	136.6812227	112.4045802	124.5429014	17.16617854
Pv-sshfwdtc-86	208.0786026	89.1221374	148.60037	84.11492321
Pv-sshfwdtc-93	132.0960699	49.42748092	90.76177539	58.45551986
Pv-sshfwdtc-96	268.1222707	69.27480916	168.69854	140.6063885
Pv-sshfwdtc-98	124.4541485	88.93129771	106.6927231	25.11844868
Pv-sshfwdtc-99	187.1179039	46.94656489	117.0322344	99.11610434
Pv-sshfwdtc-102	231.0043668	52.67175573	141.8380613	126.1001986
Pv-sshfwdtc-105	119.650655	47.51908397	83.5848695	51.00472301
Pv-sshfwdtc-106	309.8253275	51.14503817	180.4851828	182.9145867

Continuación (6 h FN).

EST	Densidad Normalizada I	Densidad Normalizada II	Promedio	Desviación Estándar
Pv-sshfwdtc-108	67.03056769	48.09160305	57.56108537	13.39187033
Pv-sshfwdtc-111	161.5720524	91.22137405	126.3967132	49.74544172
Pv-sshfwdtc-208	293.0131004	198.2824427	245.6477716	11.45374386
Pv-sshfwdtc-211	275.3275109	93.32061069	184.3240608	128.6983134
Pv-sshfwdtc-212	355.8951965	226.7175573	291.3063769	91.34238466
Pv-sshfwdtc-213	207.860262	97.70992366	152.7850928	77.88805119
Pv-sshfwdtc-217	314.8471616	132.6335878	223.7403747	128.8444537
Pv-sshfwdtc-219	388.8646288	146.9465649	267.9055969	171.0619035
Pv-sshfwdtc-223	216.8122271	96.3740458	156.5931364	85.16265471
Pv-sshfwdtc-224	365.2838428	197.519084	281.4014634	118.6275986
Pv-sshfwdtc-231	113.9738	158.9694656	136.4716328	31.8167403
Pv-sshfwdtc-233	348.4716157	231.1068702	289.789243	82.98940742
Pv-sshfwdtc-234	204.0076336	204.0076336	0	
Pv-sshfwdtc-237	284.279476	216.7938931	250.5366846	47.7195133
Pv-sshfwdtc-240	346.5065502	238.1679389	292.3372446	76.60696671
Pv-sshfwdtc-246	363.3187773	214.3129771	288.8158772	105.3630118

Niveles de expresión en unidades arbitrarias de los EST expresados después de 12 h del tratamiento con los FN.

EST	Densidad Normalizada I	Densidad Normalizada II	Promedio	Desviación Estándar
Acuaporina	100	100	100	0
Pv-sshfwdtc-02	158.7458746	117.7718833	138.2588789	28.9729871
Pv-sshfwdtc-04	182.1782178	170.0265252	176.1023715	8.592544257
Pv-sshfwdtc-05	117.1617162	102.1220159	109.641866	10.63467404
Pv-sshfwdtc-07	79.5379538	59.15119363	69.34457371	14.41561636
Pv-sshfwdtc-08	119.8019802	140.8488064	130.3253933	14.88235351
Pv-sshfwdtc-13	65.34653465	63.12997347	64.23825406	1.56734544
Pv-sshfwdtc-14	76.23762376	61.53846154	68.88804265	10.39387729
Pv-sshfwdtc-17	169.6369637	130.7692308	150.2030972	27.48363752
Pv-sshfwdtc-19	114.5214521	88.85941645	101.6904343	18.14579946
Pv-sshfwdtc-21	80.52805281	71.35278515	75.94041898	6.487893981
Pv-sshfwdtc-22	95.70957096	75.59681698	85.65319397	14.22186473
Pv-sshfwdtc-29	80.85808581	69.23076923	75.04442752	8.221754399
Pv-sshfwdtc-32	104.950495	78.51458886	91.73254195	18.69300853
Pv-sshfwdtc-35	93.72937294	83.55437666	88.6418748	7.194808868
Pv-sshfwdtc-37	119.1419142	128.1167109	123.6293125	6.346139595
Pv-sshfwdtc-38	71.61716172	75.86206897	73.73961534	3.001602702
Pv-sshfwdtc-43	69.9669967	61.00795756	65.48747713	6.334997329
Pv-sshfwdtc-45	161.7161716	134.2175066	147.9668391	19.44449249
Pv-sshfwdtc-47	170.9570957	155.1724138	163.0647548	11.16145562
Pv-sshfwdtc-51	72.60726073	65.78249337	69.19487705	4.825839278
Pv-sshfwdtc-56	132.6732673	127.0557029	129.8644851	3.972217887
Pv-sshfwdtc-57	107.2607261	66.57824934	86.9194877	28.76685518
Pv-sshfwdtc-59	122.1122112	125.198939	123.6555751	2.182646138
Pv-sshfwdtc-60	127.0627063	109.8143236	118.4385149	12.19644835
Pv-sshfwdtc-61	106.9306931	114.8541114	110.8924022	5.602702836
Pv-sshfwdtc-63	48.84488449	68.96551724	58.90520086	14.22743586
Pv-sshfwdtc-65	145.2145215	98.93899204	122.0767567	32.72174065
Pv-sshfwdtc-67	75.57755776	67.63925729	71.60840753	5.613226087
Pv-sshfwdtc-75	135.9735974	127.5862069	131.7799021	5.930780673
Pv-sshfwdtc-82	91.41914191	80.1061008	85.76262135	7.999528091
Pv-sshfwdtc-84	160.3960396	137.4005305	148.8982851	16.26028042
Pv-sshfwdtc-86	115.1815182	86.20689655	100.6942074	20.48815142
Pv-sshfwdtc-93	69.30693069	72.94429708	71.12561389	2.572006439
Pv-sshfwdtc-96	109.2409241	128.3819629	118.8114435	13.53475831
Pv-sshfwdtc-98	135.3135314	111.1405836	123.2270575	17.09285531
Pv-sshfwdtc-99	89.10891089	72.94429708	81.02660399	11.43010804
Pv-sshfwdtc-102	86.13861386	80.1061008	83.12235733	4.265630896
Pv-sshfwdtc-105	101.320132	82.22811671	91.77412436	13.50009349
Pv-sshfwdtc-106	84.15841584	91.51193634	87.83517609	5.19972421

Continuación (12 h FN).

EST	Densidad Normalizada I	Densidad Normalizada II	Promedio	Desviación Estándar
Pv-sshfwdtc-108	79.20792079	88.59416446	83.90104262	6.637076545
Pv-sshfwdtc-111	94.71947195	98.40848806	96.56398001	2.608528312
Pv-sshfwdtc-208	268.6468647	295.2254642	281.9361644	18.79390794
Pv-sshfwdtc-211	151.4851485	172.1485411	161.8168448	14.61122503
Pv-sshfwdtc-212	336.3036304	316.9761273	326.6398788	13.66660846
Pv-sshfwdtc-213	180.5280528	213.2625995	196.8953261	23.14681993
Pv-sshfwdtc-217	231.3531353	307.9575597	269.6553475	54.16750794
Pv-sshfwdtc-219	275.5775578	299.204244	287.3909009	16.70659008
Pv-sshfwdtc-223	166.3366337	155.9681698	161.1524017	7.331611136
Pv-sshfwdtc-224	209.9009901	344.2970822	277.0990362	95.03238811
Pv-sshfwdtc-231	183.8283828	118.0371353	150.9327591	46.52143729
Pv-sshfwdtc-233	261.3861386	339.7877984	300.5869685	55.4383453
Pv-sshfwdtc-234	691.4191419	561.5384615	626.4788017	91.83950984
Pv-sshfwdtc-237	153.7953795	299.734748	226.7650638	103.1947171
Pv-sshfwdtc-240	213.5313531	311.9363395	262.7338463	69.58283318
Pv-sshfwdtc-246	312.2112211	323.872679	318.0419501	8.245895976