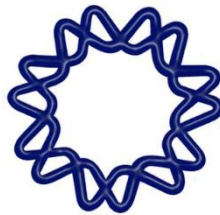




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
(U.N.A.M.)

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



*“Análisis funcional del papel que desempeña PiRACK₁ durante
la nodulación de *Phaseolus vulgaris*”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

M. en C. Tania Tayde Islas Flores

Tutores: *Dr. Federico Sánchez Rodríguez*

Dr. Marco A. Villanueva Méndez

Cuernavaca, Mor., Junio del 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mi hermoso monstruillo, gracias por tu paciencia y cariño
durante este largo camino!*

A mi apoyo incondicional y compañero. Todo ha valido la pena!

A mi madre, hermanos y sobrino, por su apoyo

*A mis amigos, amigas, primas y primos saben lo afortunada que
soy de tenerles.*

A mis maestros por sus enseñanzas y sabios consejos

A la memoria de Caro San Román, con mucho cariño!

Agradecimientos

Principalmente quiero mostrar mi agradecimiento a mis maestros, los Drs. Marco A. Villanueva y Federico Sánchez por su confianza, su apoyo, sus consejos, su paciencia y por su ejemplo. Porque me ayudaron a hacer posible este logro.

También quiero reconocer y agradecer al Dr. Gabriel Guillén, M. B. Georgina Estrada, Q. F. B. Xochitl Alvarado, Biol. Noreide Nava, Biol. Olivia Santana, Dra. Georgina Ponce, M. B. Maria Eugenia Campos, Biol. Manuel Saucedo y Dra. Guadalupe Zavala por la disposición con la que me ayudaron siempre con su trabajo, experiencia y consejos. Porque esta tesis es la culminación de un trabajo en conjunto.

Al Dr. Miguel Lara le agradezco sus observaciones, consejos y voluntad. A los miembros del Jurado de examen Drs. Gladys Cassab, Mario Rocha, Luis Cárdenas, Joseph Dubrovsky y Otto Geiger, muchas gracias por transformar mi tesis con sus observaciones, recomendaciones y correcciones siempre acertadas.

A los compañeros (que ya se fueron y actuales) del laboratorio les agradezco el haberme brindado un entorno agradable y de respeto.

A Gloria Villa de la unidad de docencia le agradezco su ayuda en los trámites requeridos durante toda mi estancia en el instituto.

A la Unidad de Oligonucleótidos y Secuenciación de DNA agradezco sus servicios, que fueron indispensables para el desarrollo de este proyecto.

Este trabajo se desarrolló en el departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de los Drs. Federico Sánchez y Marco A. Villanueva. Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) en su modalidad de tesis de posgrado.

LISTA DE CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
III.1 Simbiosis <i>Rhizobium</i> -Leguminosa	3
III.2 Tipos de Nódulos	4
III.2.1 Desarrollo de nódulos indeterminados y determinados	4
III.2.2 Autorregulación de la nodulación.....	5
III.3 El Proceso de la Nodulación	5
III.3.1 Diálogo molecular <i>Rhizobium</i> -leguminosa	7
III.3.2 Respuestas tempranas a los FNs	7
III.3.2.1 Despolarización de la membrana y oscilaciones de Ca ²⁺	8
III.3.2.2 Deformación de los pelos radicales y formación del hilo de infección	8
III.4 Diferenciación del Simbiosoma	9
III.4.1 Membrana peribacteroidal (MPB).....	9
III.4.2 Fluido peribacteroidal.....	10
III.4.3 Bacteroide	10
III.5 Factores de Nodulación (FNs)	11
III.6 Nodulinas.....	12
III.7 Fijación Biológica de Nitrógeno.....	13
III.8 Hormonas en la Nodulación	14
III.8.1 Citocininas.....	14
III.8.2 Auxinas.....	15
III.8.3 Etileno.....	15
III.8.4 Ácido jasmónico.....	15
III.8.5 Ácido abscísico	16
III.9 Temperatura.....	16
III.10 Salinidad.....	16
III.11 Luz	17
III.12 Señalización en la Nodulación	17
III.12.1 Receptores.....	17
III.13 RACK1	18
IV. ANTECEDENTES.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	22
V.1 Material Biológico	22
V.2 Extracción de Proteínas Solubles	22
V.3 SDS-PAGE y Electrotransferencia.....	22
V.4 Inmunodetección	22
V.5 Extracción de RNA.....	23
V.6 Tratamiento Hormonal.....	23
V.7 Construcciones para Silenciar y Sobre-expresar a <i>PvRACK1</i>	23
V.7.1 Clonaciones	24

V.7.2 Recombinaciones.....	24
V.8 Transformación de <i>A. rhizogenes</i> K599.....	24
V.9 Transformación de Plantas de Frijol con <i>A. rhizogenes</i> K599.....	24
V.10 Análisis de Nódulos y Raíces Transgénicas.....	25
V.11 PCR Y RT-PCR en Tiempo Real.....	26
V.12 PCR Genómico.....	26
V.13 Genome Walker.....	26
V.14 Análisis del Promotor.....	27
V.15 Procesamiento y Análisis de Nódulos por Microscopía Confocal y Electrónica.....	27
VI. RESULTADOS.....	28
VI.1 <i>PvRACK1</i> se Expresa Ubicuamente en Frijol.....	28
VI.2 Soya y Chícharo Tienen una Proteína de 36 kDa Homóloga a <i>PvRACK1</i>	29
VI.3 <i>PvRACK1</i> se Expresa Ubicuamente Durante la Nodulación.....	29
VI.4 Reguladores Hormonales de la Nodulación Inducen a <i>PvRACK1</i> en Raz.....	31
VI.5 <i>PvRACK1</i> es Codificada por un Gen en <i>P. vulgaris</i>	32
VI.6 Promotor de <i>PvRACK1</i>	32
VI.7 Fenotipo del Silenciamiento de <i>PvRACK1</i>	33
VI.8 La Reducción de la Expresión de <i>PvRACK1</i> Afecta el Desarrollo del Nódulo.....	35
VI.9 Efecto del Silenciamiento de <i>PvRACK1</i> en la Ultraestructura de los Nódulos.....	36
VI.10 El Exceso de <i>PvRACK1</i> Afecta Múltiples Procesos del Desarrollo.....	37
VI.11 La Sobre-expresión de <i>PvRACK1</i> Afecta la Integridad del Nódulo.....	39
VI.12 Efecto de la Sobre-expresión de <i>PvRACK1</i> en la Ultraestructura de los Nódulos.....	40
VII. DISCUSIÓN.....	42
VII.1 Perspectivas.....	46
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	47
ANEXO 1 (Publicación en <i>Physiologia Plantarum</i>).....	57
ANEXO 2 (Publicación en <i>MPMI</i>).....	76

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.- Diferencias en las etapas de desarrollo de nódulos indeterminados y determinados	6
Fig. 2.- Estructura de los FNs.....	11
Fig. 3.- <i>PvRACK1</i> se expresa ubicuamente en frijol.....	28
Fig. 4.- Los anticuerpos anti- <i>PvRACK1</i> reconocen a una proteína de 36 kDa en semilla de chícharo y ejes embrionarios de soya	29
Fig. 5.- Análisis de expresión de <i>PvRACK1</i> en la nodulación de frijol	30
Fig. 6.- ABA, IAA, citocininas y giberelinas inducen la expresión de <i>PvRACK1</i> en raíces de frijol	31
Fig. 7.- PCR genómico y RT-PCR DE <i>PvRACK1</i>	32
Fig. 8.- Secuencia del promotor de <i>PvRACK1</i>	33
Fig. 9.- Fenotipo del silenciamiento de <i>PvRACK1</i>	34
Fig. 10.- Anatomía de nódulos transgénicos de 26 dpi control y <i>PvRACK1</i> -silenciados.....	35
Fig. 11.- Tamaño de células infectadas y no infectadas de nódulos control y <i>PvRACK1</i> -silenciados	36
Fig. 12.- Ultraestructura de nódulos control y <i>PvRACK1</i> -silenciados	37
Fig. 13.- Fenotipo de la sobre-expresión de <i>PvRACK1</i>	38
Fig. 14.- Anatomía de nódulos transgénicos de 26 dpi control y sobre-expresantes de <i>PvRACK1</i>	39
Fig. 15.- Ultraestructura de nódulos control y sobre-expresantes de <i>PvRACK1</i>	41

I. RESUMEN

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es un proceso complejo, que involucra el reconocimiento de moléculas señal por parte de ambos simbioses. La transducción de estas señales, conlleva a la orquestación de un diálogo molecular que culmina con la formación de un nuevo órgano en la raíz de la planta, el nódulo. La importancia de este proceso implica que los genes de muchas plantas están involucrados en el desarrollo y función del nódulo; sin embargo, sólo algunos de estos genes han sido identificados.

RACK1 (*Por sus siglas en inglés: Receptor for Activated C Kinase 1*), es una proteína de andamiaje muy versátil que se une a una gran variedad de ligandos de forma regulada y que participa activamente en diversas vías de transducción de señales. En plantas, se ha observado que media múltiples respuestas hormonales y procesos del desarrollo (Chen *et al.*, 2006; Ullah *et al.*, 2008). RACK1 modula la producción de ROS, participa en la inmunidad innata en arroz (Nakashima *et al.*, 2008), y es un componente de la subunidad 40S ribosomal in *Arabidopsis* (Chang *et al.*, 2005). Sin embargo, el conocimiento que se ha adquirido de RACK1 en plantas los últimos años, no ha sido suficiente para conocer su función.

En un trabajo previo (Islas-Flores *et al.*, 2009) se identificó una proteína homóloga a RACK1 en ejes embrionarios de *Phaseolus vulgaris*, que fue denominada PvRACK1. Esta proteína tiene un peso molecular de 36 kDa (codificada por 975 pb's de mRNA), y presenta 7 dominios WD-40. En el presente trabajo, se llevó a cabo un análisis de la expresión, silenciamiento y sobre-expresión de PvRACK1 durante la nodulación de *P. vulgaris*, con la finalidad de obtener información que permita conocer qué papel desempeña en este proceso. Se observó que PvRACK1 se induce con tratamientos hormonales (auxinas, ácido abscísico, citocininas y giberelinas) durante el desarrollo de la raíz; mientras que, durante el desarrollo del nódulo, la expresión de PvRACK1 aumenta a los 9-10 días post-inoculación, lo cual sugiere que puede estar desempeñando un papel importante después de la iniciación del meristemo del nódulo y de la infección por *Rhizobium*.

El análisis del silenciamiento (RNA de interferencia) y sobre-expresión de PvRACK1 se llevó a cabo en raíces transgénicas de plantas compuestas de *P. vulgaris* inoculadas con *Rhizobium tropici*. Los niveles de transcrito de PvRACK1 fueron monitoreados en raíces y nódulos transgénicos, por medio de análisis por qRT-PCR. Se observó que la regulación de la expresión de PvRACK1 es esencial para que la nodulación se lleve a cabo correctamente, ya que al modificar sus niveles de expresión por medio del silenciamiento o sobre-expresión; la organogénesis, desarrollo e integridad del nódulo son afectados. El silenciamiento y sobre-expresión de PvRACK1 muestran un fenotipo claro en el cual la nodulación es inhibida (50-24 y 80%, respectivamente). Los análisis por microscopía revelaron que en los nódulos silenciados las células infectadas y no infectadas son de menor tamaño que en los controles (80 y 60%, respectivamente). Estos resultados indican que PvRACK1 desempeña un papel indispensable en la expansión celular y en la integridad del simbiosoma y del nódulo.

II. ABSTRACT

The establishment of symbiosis is a complex process that involves recognition of the signal molecules and signaling by both, *Rhizobium* and legume (molecular dialogue). The transduction of these signals, lead to the orchestration of molecular dialogue that culminates with the formation of a new organ at the root of the plant, the nodule. The importance of this process implies that many plant genes are involved in nodule development and function; however, few of these genes have been identified.

RACK1 (Receptor for Activated C Kinase) is a highly-conserved, eukaryotic protein of the WD-40 repeat family. Its peculiar β -propeller structure allows its regulated interaction with multiple proteins in various plant signal-transduction pathways, including those arising from hormone responses, development, and environmental stress (Chen *et al.*, 2006; Ullah *et al.*, 2008). RACK1 also regulates the ROS production, is involved in innate immunity in rice (Nakashima *et al.*, 2008), and is an structural part of the ribosome 40S subunit in *Arabidopsis* (Chang *et al.*, 2005). However, the knowledge acquired from plant RACK1 in recent years, there has not been enough to know their function.

In a previous study (Islas-Flores *et al.*, 2009) the RACK1 homologue in bean was identified as a 36 kDa protein (encoded by 975 bp's), which contained 7 WD-40 domains, and was called *PvRACK1*. In this work we analyzed the *PvRACK1* expression, silencing and over-expression during *Phaseolus vulgaris* nodulation with the aim of obtaining information about its role in this process. During *P. vulgaris* root development, *PvRACK1* mRNA expression was induced by treatment with auxins, abscisic acid, cytokinin, and gibberellic acid. In addition, during *P. vulgaris* nodule development, *PvRACK1* mRNA was highly accumulated at 9-18 days post-inoculation suggesting an important role after nodule meristem initiation and *Rhizobium* nodule infection.

PvRACK1 transcript accumulation was down-regulated by a specific RNA interference construct; and over-expressed in transgenic roots of composite plants of *P. vulgaris* inoculated with *Rhizobium tropici*. *PvRACK1* transcript levels were monitored by qRT-PCR analysis in individual transgenic roots and nodules. It was noted that the regulation of its expression is essential for normal nodulation to occur and that changing its expression by silencing or over-expression, lead to dramatic effects in the organogenesis, development and nodule integrity. We observed a clear phenotype in *PvRACK1*-knockdown and over-expressing, in which nodule number was impaired (less nodulation of 50-24% for silencing, and 80% for over-expression). Microscopic analysis indicated that, in *PvRACK1*- knockdown nodules, infected and uninfected cells were considerably smaller (80% and 60%, respectively), than in control nodules. These findings indicate that *PvRACK1* has a pivotal role in cell expansion and in symbiosome and bacteroid integrity during nodule development.

III. INTRODUCCIÓN

Las plantas son esenciales para la vida en nuestro planeta, convierten la energía solar en energía química que eventualmente usamos como alimento, combustible y fibra. Entre los bloques moleculares básicos a partir de los cuales se sintetizan todas las moléculas indispensables para la vida, el elemento más limitante para la síntesis de proteínas, aminoácidos, nucleótidos, clorofila y vitaminas, es el nitrógeno. El nitrógeno es un elemento muy abundante en la atmósfera constituyendo el 78.1% de esta (Ferguson *et al.*, 2010), pero las plantas y animales solo lo pueden asimilar en su forma reducida (nitrato, amonio) (Stougaard, 2000). Algunas plantas son capaces de adquirir nitrógeno del aire a través de un proceso llamado fijación simbiótica de nitrógeno; estas plantas pertenecen a la familia Leguminosae. Ésta es una familia grande y diversa de plantas superiores con cerca de 18,000 especies. La característica distintiva de algunas leguminosas es fijar nitrógeno a partir de una simbiosis con diversos grupos de bacterias gram-negativas que inducen la formación de nódulos (Chen *et al.*, 2003). Ejemplos de estas bacterias incluyen *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (D’Haeze and Holsters, 2002) y algunas especies de *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001; Vandamme *et al.*, 2002), *Ralstonia* (Chen *et al.*, 2001), y *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001). Estas bacterias son colectivamente llamadas rhizobia (Gage, 2004). El desarrollo del nódulo fijador de nitrógeno, es el resultado de la simbiosis entre una planta leguminosa y una bacteria rhizobia, y está determinado por el intercambio de compuestos (diálogo molecular) entre ambos simbioses (Schultze and Kondorosi, 1998). Dada la importancia de este proceso, las vías de transducción de señales que participan en este evento han sido motivo de estudio en los últimos años. A la fecha se han logrado identificar algunos de los componentes que participan en cada uno de los pasos de este proceso tales como: receptores, segundos mensajeros, proteínas G, proteínas cinasas, factores de transcripción, etc.

III.1 Simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacterias Gram-negativas que en su forma de vida libre son móviles, aerobias, no fijan nitrógeno atmosférico y no forman esporas. Como simbioses, las bacterias dentro de los nódulos radicales se diferencian en bacteroides, los cuales tienen formas irregulares, aumentan su tamaño, se alimentan de formas carbonadas sintetizadas por la planta huésped, son anaeróbicos facultativos y fijan nitrógeno atmosférico (Graham *et al.*, 1963; Gollop *et al.*, 1984).

La relación simbiótica entre *Rhizobium* y su correspondiente huésped permite la morfogénesis de estructuras especializadas llamadas nódulos, donde el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio y de esta forma puede ser asimilado por la planta hospedera. Este proceso es determinado por el “diálogo molecular” de compuestos químicos secretados entre la bacteria Rhizobiácea y la planta hospedera y este diálogo es específico, por lo cual sólo ciertas bacterias *Rhizobium* pueden formar nódulos en el hospedero específico. El diálogo molecular consiste en la segregación por parte de la raíz, de compuestos fenólicos, generalmente flavonoides, que inducen en *Rhizobium* la transcripción de los genes de nodulación (genes *nod*) (Dénarié *et al.*, 1993). Los productos de los genes *nod* están involucrados en la síntesis de Factores de Nodulación (FNs), los cuales a su vez, al ser percibidos por la planta participan en la morfogénesis de los nódulos. La presencia de bacterias rhizobias compatibles y sus correspondientes

FNs son suficientes para disparar un programa de la planta que conlleva al desarrollo del nódulo (Debellé *et al.*, 2001). Los nódulos son los órganos que se forman en la raíz de las plantas infectadas por rhizobia, y el sitio donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno.

III.2 Tipos de Nódulos

Dependiendo del sistema simbiótico podemos encontrar dos tipos de nódulos: determinados o indeterminados. La forma del nódulo es establecida por la planta, no por la bacteria. Las diferencias entre los dos tipos de nódulos son: 1.- el lugar en el que se llevan a cabo las primeras divisiones celulares; 2.- el mantenimiento del meristemo, y 3.- la forma de los nódulos maduros (Newcomb *et al.*, 1979). El tipo de nódulo que se formará, estará condicionado por el lugar en donde se induzcan las divisiones mitóticas en la raíz. Si las divisiones se inducen en el córtex interno se originan nódulos indeterminados (alfalfa, chícharo y trébol), que son de forma ovalada y tienen un meristemo persistente; y si lo hacen en el córtex externo, se originan nódulos determinados (soya, frijol y *Lotus*), que son redondos y su actividad meristemática desaparece después de la iniciación del nódulo (D'Haeze and Holsters, 2002).

III.2.1 Desarrollo de nódulos indeterminados y determinados

En los nódulos indeterminados, los primeros eventos de división celular ocurren anticlinalmente en el córtex externo, seguido por divisiones periclinales en la endodermis y periciclo (Fig. 1 pasos 4 y 5, izquierda); colectivamente esas divisiones forman el primordio del nódulo. Los nódulos indeterminados, tienen la característica de poseer un meristemo persistente, por lo cual tienen una forma cilíndrica y las capas celulares se encuentran organizadas radialmente. El meristemo apical continuamente produce nuevas células que son infectadas por las bacterias. Los nódulos indeterminados maduros contienen una población heterogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno debido a la continua actividad mitótica, lo que da lugar a un gradiente de los estados de desarrollo del nódulo conforme este continúa elongándose. Estos nódulos también tienen un sistema menos vascularizado que los nódulos determinados (Ferguson *et al.*, 2010; Newcomb *et al.*, 1979; Rolfe and Gresshoff, 1988; Hirsh, 1992; Verma, 1992).

Los nódulos determinados son usualmente esféricos, carecen de meristemo persistente y no muestran un gradiente de desarrollo evidente (Fig. 1 derecha). Los primeros eventos de división celular en los nódulos determinados ocurren sub-epidérmicamente en el córtex externo. Seguido de las primeras divisiones celulares anticlinales inducidas por *Rhizobium* en la sub-hipodermis (Newcomb *et al.*, 1979; Rolfe and Gresshoff, 1988), se llevan a cabo divisiones celulares en el periciclo formándose así dos zonas con actividad meristemática, que convergen para formar el primordio nodular. Una parte del primordio nodular se constituye de células con alto grado de vacuolización que son derivadas del periciclo, y que a su vez, conforman el parénquima del nódulo (Newcomb *et al.*, 1979; Hirsh, 1992; Verma, 1992). Estas células rodean a otro grupo de células no vacuoladas derivadas de la hipodermis y que conforman el tejido central del nódulo que está en constante actividad mitótica hasta los 10 días post-inoculación (Fernández-Luqueño *et al.*, 2008). Estas células centrales son infectadas por rhizobia que son liberadas de los hilos de infección y diferenciadas en bacteroides, los cuales se constituyen en simbiosomas. Los simbiosomas de nódulos determinados, a diferencia de

los de nódulos indeterminados, pueden contener más de un bacteroide. Los nódulos determinados maduros contienen una población relativamente homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno, y la diferenciación de las células infectadas ocurre sincrónicamente. Cuando los nódulos senescen, se forman nuevos nódulos en regiones de la raíz desarrolladas recientemente (Rolfe and Gresshoff, 1988). A diferencia de los nódulos indeterminados, estos no poseen un meristemo persistente, por lo cual su crecimiento se debe principalmente a la expansión celular ya que la división celular cesa durante el desarrollo. La naturaleza del crecimiento de estos nódulos les confiere una morfología esférica (Hirsch, 1992).

III.2.2 Autorregulación de la nodulación

Cuando la nodulación es inducida, la planta usa el sistema de control homeostático que regula el número de nódulos de tal forma que el costo-beneficio de la nodulación esté equilibrado. En las leguminosas este control lo logra la autorregulación de la nodulación, proceso en el cual el primordio nodular envía una señal a la hoja, la cual a su vez, produce un inhibidor que bloquea la progresión de primordios nodulares (Gresshoff, 1993). En tanto, se desarrollan los nódulos suficientes durante el tiempo en el cual se establece la retroalimentación de la señal; después de la cual, se inician primordios nodulares pero no siguen su desarrollo (Gresshoff, 2003). Hay factores internos y externos que actúan como reguladores negativos de la nodulación. Mutantes que son incapaces de percibir o sintetizar esos factores, exhiben mayor número de nódulos. Muchos de estos factores funcionan en la vía de autorregulación de la nodulación. La autorregulación de la nodulación inicia durante el desarrollo del nódulo por la síntesis de señales Q derivadas de la raíz (Q es un péptido relacionado a CLAVATA3/ESR) (Okamoto *et al.*, 2009). Las señales Q viajan al primordio nodular, donde éstas o un producto de su acción son percibidas por un receptor rico en leucinas llamado GmNARK (*por sus siglas en inglés: Glycine max Nodule Autoregulation Receptor Kinase*)/LjHAR1 (*por sus siglas en inglés: Hyper-nodulation Aberrant Root 1*)/MtSUNN (*por sus siglas en inglés: Super Numerary Nodules*) (Krusell *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2002). La percepción de las señales Q en la hoja resulta en la producción de un nuevo inhibidor derivado del primordio llamado SDI (*por sus siglas en inglés: Shoot-Derived Inhibitor*), que viaja por el floema a la raíz donde inhibe la nodulación (Gresshoff and Delves 1986; Lin *et al.*, 2009).

III.3 El Proceso de la Nodulación

El desarrollo coordinado de la raíz es un factor clave para la formación de nódulos. La nodulación consiste de una serie de etapas espacial y temporalmente ordenadas que permitirán que la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa dé lugar a nódulos fijadores de nitrógeno (Fig. 1). Primero, la planta percibe los FNs y responde con respuestas locales y respuestas a distancia, tales como enroscamiento de los pelos radicales y divisiones celulares de las células corticales. Además de ser requeridos al inicio, los FNs son producidos por la bacteria dentro del hilo de infección (Herder *et al.*, 2007). Durante las primeras 12-24 h, la bacteria dispara toda una serie de cambios morfológicos como son la deformación y enroscamiento del pelo radical, el desarrollo del hilo de infección, y la activación de la división celular en el córtex de la raíz. Estas respuestas morfológicas son consideradas como las características representativas de la nodulación (Fig. 1) (Wais *et al.*, 2002).

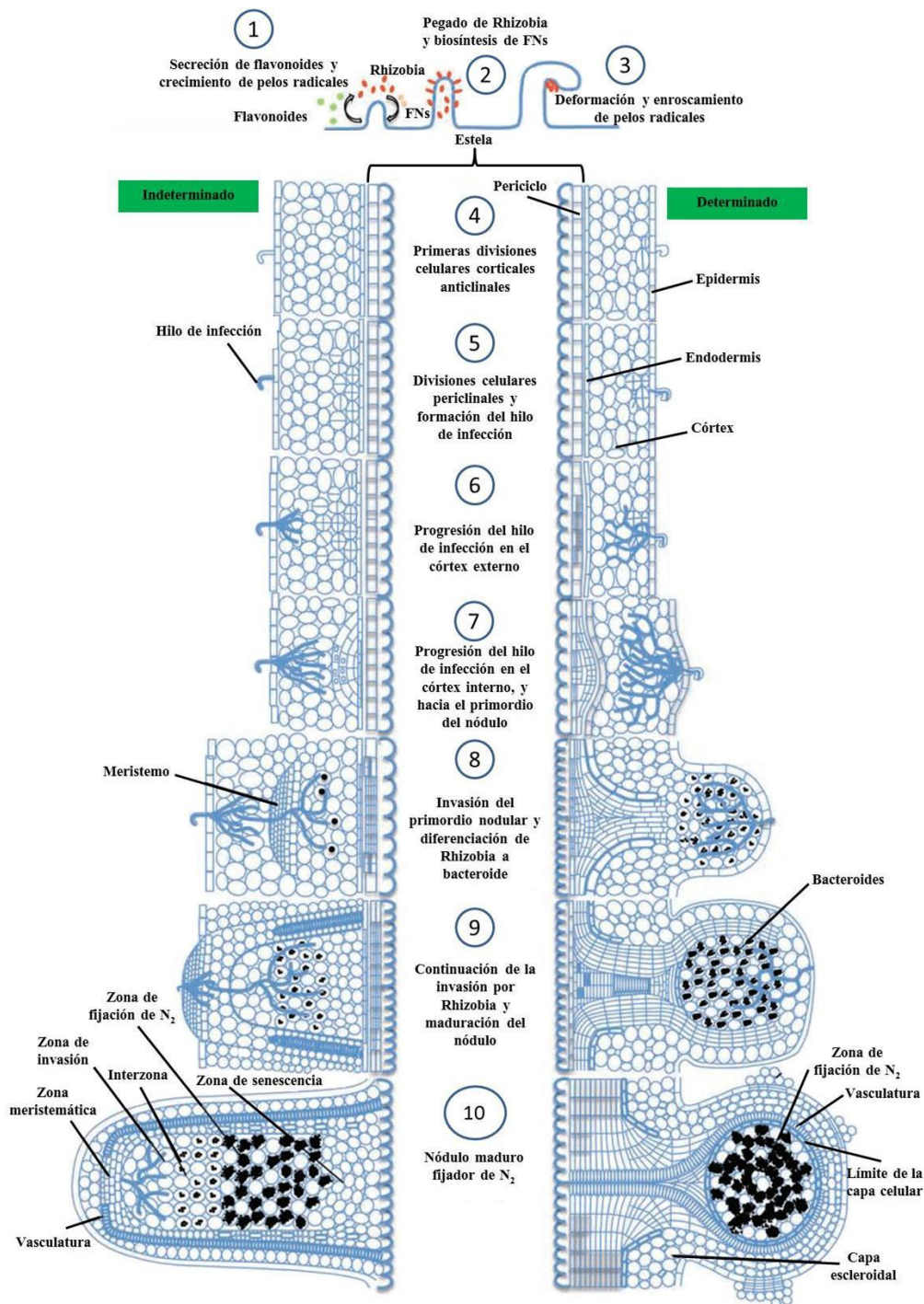


Fig. 1.- Diferencias en las etapas de desarrollo de nódulos indeterminados y determinados. Etapas del desarrollo de nódulo indeterminado (chicharo; izquierda) y determinado (soya; derecha). Los pelos radicales que emergen liberan compuestos flavonoides, los cuales atraen bacterias Rhizobiáceas compatibles y las estimulan a producir FNs. El pelo radical se deforma dejando un espacio en el cual son atrapadas las bacterias. El hilo de infección se empieza a formar y la bacteria entra a la planta. Se observan las primeras divisiones celulares en la corteza interna (nódulos indeterminados) o en la capa celular sub-epidermal (nódulos determinados). Capas adicionales de células (córtez y periciclo) se dividen para formar el primordio del nódulo. Los hilos de infección progresan hacia el primordio en donde se liberan las bacterias, y posteriormente son rodeadas por membrana plasmática de la planta, en donde se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno. Las etapas de desarrollo, tipos de tejidos y zonas de nodulación están indicadas (modificado de [Ferguson et al., 2010](#)).

III.3.1 Diálogo molecular *Rhizobium*-leguminosa

La infección de la raíz por *Rhizobium* es un proceso que se inicia por eventos de pre-infección en la rizósfera. Un pre-requisito para el establecimiento de la asociación simbiótica, es que la planta se encuentre en condiciones deficientes de nitrógeno, lo que aumenta la producción de compuestos fenólicos por parte de la raíz (Coronado *et al.*, 1995). Las señales fenólicas (flavonoides), son percibidas por la bacteria; ésta a su vez responde moviéndose y pegándose a sitios localizados en la raíz por quimiotaxis positiva y produciendo los FNs. La punta de los pelos radicales que están emergiendo son los blancos principales para la infección, probablemente porque sus paredes celulares son más delgadas, lo que permite el re-arreglo de los microtúbulos, el cambio del tráfico vesicular hacia la punta en crecimiento, y la subsecuente penetración de la Rhizobiácea. Las Rhizobiáceas tienen dos formas de entrar a la planta hospedera: por los pelos radicales o a través de heridas en el tejido epidérmico de la raíz (Oldroyd and Downie, 2008).

La inducción de los genes *nod* por los flavonoides de la planta huésped es el paso inicial del intercambio de señales recíprocas entre *Rhizobium* y leguminosa. Los polisacáridos de la superficie celular de las Rhizobiáceas también están involucrados en el pegado, penetración e invasión de la bacteria. Los rhizobios expresan una proteína que se localiza en la superficie celular, llamada ricadhesina, que participa en la adherencia de la bacteria al pelo radical de la planta. Esta proteína se une a Ca^{2+} y puede actuar captando complejos de Ca^{2+} en la superficie de los pelos radicales. Otras moléculas, como las lectinas, que son proteínas que reconocen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de pelos radicales y en la superficie de los rhizobia. Los polisacáridos de superficie celular no son los determinantes principales de la especificidad del hospedero; sin embargo, es claro que estos polisacáridos desempeñan un papel importante en la interacción hospedero-específica (Laeremans and Vanderleyden, 1998; Cárdenas *et al.*, 2000).

III.3.2 Respuestas tempranas a los FNs

La percepción a los FNs inicia una cascada de transducción de señales. Ésta involucra canales iónicos localizados en la membrana nuclear (MtDMI1, LjCASTOR y POLLUX) (Ané *et al.*, 2004; Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005; Riely *et al.*, 2007), dos nucleoporinas (LjNup133 y LjNUP85) (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007), y una proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CCaMK, MtDMI3/PsSYM9) (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004). Múltiples capas y tipos celulares deben sincronizar su desarrollo con la finalidad de lograr la organogénesis del nódulo.

Las primeras respuestas inducidas por los FNs se llevan a cabo en sitios espacialmente separados: la epidermis, las células corticales y el periciclo (Hirsh, 1992; Geurts and Franssen, 1996; Compaan *et al.*, 2001). La formación de nódulos fijadores de nitrógeno consiste de dos programas importantes de desarrollo: 1) las respuestas epidérmicas preparan a las células para la infección bacteriana; y 2) la reactivación de la división celular en el córtex que da origen al primordio del nódulo (Ding *et al.*, 2008). La epidermis de la raíz representa la primera barrera con la que se enfrenta la bacteria, y en muchas interacciones *Rhizobium*-leguminosa las células del pelo radical juegan un papel

central en facilitar la infección bacteriana e influyen sobre cuándo, dónde y cuantos nódulos se formarán. Cuando las bacterias están pegadas a la punta del pelo radical, se concentra el efecto de los FNs a través de la raíz; por lo tanto, la percepción de los FNs está probablemente limitada a las células epidérmicas. Este puede ser el motivo por el cual las primeras respuestas a *Rhizobium* ocurren en la epidermis (Oldroyd and Downie, 2008). Para la formación de un primordio nodular se requiere de la des-diferenciación de las células corticales que se encuentran completamente diferenciadas. Los FNs inducen la expresión de genes, que a su vez reactivan la actividad mitótica de las células corticales e inducen la formación del primordio nodular y los haces vasculares, permitiendo el desarrollo del nódulo (Cárdenas *et al.*, 1995; D'Haese and Holsters, 2002). La actividad meristemática que da lugar al nódulo, inicia antes de la formación del hilo de infección (Newcomb *et al.*, 1979; Dudley *et al.*, 1987; Verma, 1992; Geurts *et al.*, 2005; Herder *et al.*, 2007).

III.3.2.1 Despolarización de la membrana y oscilaciones de Ca^{2+}

Una de las primeras respuestas después de la exposición a los FNs es la despolarización de la membrana, la cual es observada aproximadamente 1 min después del tratamiento con los FNs. Esta despolarización es causada por un rápido influjo de Ca^{2+} inducido a los pocos segundos de la adición de los FNs, seguido por el eflujo de Cl^- y K^+ . El influjo de Ca^{2+} es indispensable para que se lleve a cabo la despolarización de la membrana debido a que el antagonista del canal de calcio Nifedipina, así como el EGTA, inhiben la despolarización de la membrana inducida por los FNs (Revisado por Geurts and Bisseling, 2002). Oscilaciones en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico son inducidas subsecuentemente en las mismas células algunos minutos después de la inducción de los flujos de Ca^{2+} y aproximadamente 10 min después de la aplicación de los FNs (Revisado por Ferguson *et al.*, 2010). Las oscilaciones de Ca^{2+} están restringidas a la región nuclear, específicamente al nucleoplasma y al citoplasma asociado al núcleo (Oldroyd and Downie, 2008), y esto parece ser inducido por un influjo de Ca^{2+} en la punta del pelo (Cárdenas *et al.*, 1998; Felle *et al.*, 1998; Shaw and Long, 2003). Los canales iónicos y las nucleoproteínas son requeridos para estos eventos de oscilaciones de Ca^{2+} . De 10 a 20 min después de la adición de los FNs, se han observado incrementos repetidos de Ca^{2+} citoplásmico, particularmente alrededor del núcleo en *Medicago sativa* (Ehrhardt *et al.*, 1996), *Medicago truncatula* (Wais *et al.*, 2000), *Pisum sativum* (Walker *et al.*, 2000), *Phaseolus vulgaris* (Cárdenas *et al.*, 1998) and *Lotus japonicus* (Harris *et al.*, 2003), lo que supone que las oscilaciones periódicas de Ca^{2+} (calcium spiking) son una característica común de la nodulación simbiótica (Miwa *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2000).

III.3.2.2 Deformación de los pelos radicales y formación del hilo de infección

La primera respuesta morfológica detectable después de la exposición a los FNs es la deformación de los pelos radicales. El pegado de la bacteria a los pelos radicales estimula la deformación de estos (Esseling *et al.*, 2003). Durante las primeras 3 h se hincha la punta del pelo radical dando lugar al desarrollo de una nueva zona de crecimiento. Los pelos radicales se enroscan de 6-8 h después del pegado de la bacteria (Turgeon and Bauer, 1982; 1985). Algunos pelos radicales se enroscan hasta 360° encapsulando una pequeña porción de bacterias en división celular. El enroscamiento es causado por el crecimiento constante y reorientado del pelo radical. Una micro-colonia

queda atrapada y tiene la capacidad de aumentar la concentración de los FNs y enzimas que degradan la pared celular. Las bacterias, posteriormente penetran entonces la pared celular y se lleva a cabo un ciclo de síntesis y digestión de pared celular resultando en la formación del hilo de infección (van Spronsen *et al.*, 1994; Esseling *et al.*, 2003; Oldroyd and Downie, 2008). En soya este proceso ocurre 12 h después del contacto del pelo radical con la bacteria (Turgeon and Bauer, 1982; 1985) El hilo de infección actúa como pasaje para la bacteria y avanza por el pelo radical hasta alcanzar las células del córtex que formaron el primordio. Las bacterias son liberadas en el citoplasma de las células del hospedero a través de un proceso parecido a la endocitosis. Este paso es crucial ya que se lleva a cabo sin activar la respuesta de defensa de la planta hospedera. La bacteria continúa dividiéndose dentro de la célula hospedera antes de diferenciarse en bacteroides e iniciar la fijación de nitrógeno. La división celular de las células corticales cesa cuando las células han sido infectadas, aunque en nódulos indeterminados, el meristemo nodular persiste generando nuevas células que se siguen infectando; y en nódulos determinados, la división celular termina antes de que se dé inicio a la fijación de nitrógeno (en soya, aproximadamente 10 días después de la infección). Las células corticales, al cesar la división celular entran en una etapa de síntesis de DNA que resulta en endo-reduplicación, con el consecuente aumento en el contenido de DNA, que aumenta a 64n (Verma, 1992).

III.4 Diferenciación del Simbiosoma

El desarrollo del nódulo es un evento que se lleva a cabo de forma paralela al desarrollo del bacteroide. Dependiendo del tipo de nódulo (indeterminado o determinado), las *Rhizobia* infectan las células centrales del nódulo a través del hilo de infección y/o a través de la división de células que ya están infectadas, según se trate de un nódulo indeterminado o determinado. Una vez que las bacterias son liberadas del hilo de infección por endocitosis, estas quedan envueltas por una membrana de origen vegetal. Esta estructura es denominada simbiosoma, y es la unidad básica de fijación de nitrógeno en el nódulo (Udvardi and Day, 1997). En un simbiosoma se puede distinguir la membrana peribacteroidal (MPB), el bacteroide, y el fluido peribacteroidal (FPB). El término simbiosoma fue utilizado por primera vez por Roth *et al.*, (1988) para describir una estructura parecida a un organelo que se forma después de la endocitosis de un microsimbionte por una célula hospedera. La estructura de un simbiosoma de soya consiste de una membrana derivada del hospedero (MPB), que envuelve uno o varios microsimbiontes (bacteroide), y crea un espacio interno que es ocupado por el FPB (Turgeon and Bauer, 1982)

III.4.1 Membrana peribacteroidal (MPB)

La MPB es una membrana de origen vegetal que separa a los bacteroides del citoplasma de la célula vegetal en los nódulos (Udvardi *et al.*, 2001). La MPB tiene algunas propiedades de tonoplasto (por la fusión de vesículas procedentes tanto del aparato de Golgi, como del retículo endoplásmico, que conducen al crecimiento de la MPB) y de membrana plasmática. Su proliferación inicia en el momento en el cual la bacteria es liberada del hilo de infección (si este compartimento membranar no se forma adecuadamente o es desintegrado, se activa la respuesta de defensa), y hay una división continua y sincronizada de las bacterias rodeadas de MPB. Las bacterias dejan de dividirse antes de iniciarse la fijación de nitrógeno. La MPB es absolutamente necesaria para controlar el flujo de metabolitos entre ambos simbiosomas, en la regulación de la

fijación del nitrógeno, y en el mantenimiento de la simbiosis (Day *et al.*, 2001). Por otro lado, vesículas provenientes del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico que se fusionan a la MPB transportan determinados componentes proteicos, como la H⁺-ATPasa. La actividad de esta proteína genera la acumulación de H⁺ en el espacio peribacteroidal, generando un gradiente eléctrico y de pH a través de la MPB. El bacteroide responde excretando H⁺ en forma de NH₄⁺ (Verma *et al.*, 1978; Day *et al.*, 2001). Los iones amonio pasan a través de un transportador específico de la membrana peribacteroidal al citoplasma de la célula vegetal en donde el sistema GS-GOGAT (*por sus siglas en inglés: Glutamine Synthetase-Glutamate synthase*) los incorpora en forma de aminoácidos, amidas o ureidos. Además de un gradiente de pH, se genera un gradiente electroquímico aprovechado por determinados transportadores, como por ejemplo los de malato y amonio, con el fin de proporcionar sustratos carbonados al bacteroide (Udvardi and Day, 1997; Day *et al.*, 2001).

III.4.2 Fluido peribacteroidal

El fluido peribacteroidal o espacio peribacteroidal, es el material soluble existente entre la membrana peribacteroidal y el bacteroide, mantiene en contacto la superficie de ambos, estableciendo una zona que permite la interacción. Es donde se acumula una alta concentración de H⁺ debido a la actividad de ATPasa de la membrana peribacteroidal. Además, desde el aparato de Golgi se secretan al fluido peribacteroidal, proteínas características de lisosomas tales como proteasas, trehalasas ácidas y manosidasas, que hacen del simbiosoma un organelo con propiedades líticas (Mellor, 1989). El equilibrio en el intercambio de metabolitos entre la planta y el microorganismo resulta vital para la simbiosis, de tal forma que, una alteración del mismo inducida por alguno de los dos miembros de la asociación, llevaría a una acidificación en el interior del simbiosoma. Esta conduciría a la activación de las hidrolasas y, por lo tanto, a la muerte del simbiosoma y a la senescencia del nódulo (Andreev *et al.*, 2005).

III.4.3 Bacteroide

La diferenciación de los bacteroides fue observada por primera vez por Beijerinck en 1888. Las Rhizobiáceas sufren destinos diferentes al invadir las células del córtex, dependiendo del sistema simbiótico. En nódulos indeterminados las bacterias que se liberan al citoplasma se dividen pocas veces antes de diferenciarse. En nódulos determinados sin embargo, las células infectadas mantienen momentáneamente la actividad mitótica, y las bacterias en el interior se dividen múltiples veces con el fin de poder mantener su presencia en las células vegetales recién formadas. En el proceso de diferenciación los bacteroides pueden aumentar su tamaño original de cuatro a siete veces, como en el caso de *Sinorhizobium meliloti*, o bien adquirir un forma de “Y”, como el caso de *Rhizobium leguminosarum* (Oke and Long, 1999). Los bacteroides pueden llegar a ser hasta 40 veces más grandes que los bacilos a partir de los que se desarrollan, y hasta varios miles se encuentran en una sola célula vegetal. La fijación de nitrógeno no se inicia sino hasta que los rhizobia se han diferenciado en bacteroides. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo. Cuando el nódulo se deteriora, las bacterias se liberan a la rizosfera. Estas formas proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado latente en el suelo (Oke and Long, 1999; Mergaert *et al.*, 2006).

III.5 Factores de Nodulación (FNs)

Los FN's son moléculas señal sintetizadas y secretadas por el microsimbionte en respuesta a compuestos flavonoides liberados a la rizósfera por raíces de plantas leguminosas. Los FN's inducen una serie de respuestas en la planta, que incluyen la formación y deformación de los pelos radicales, alcalinización intra y extracelular, despolarización de la membrana, cambios en los flujos iónicos (por ejemplo, oscilaciones de Ca^{2+}), expresión de nodulinas tempranas, y la formación del primordio nodular. (D'Haeze and Holsters, 2002; Cárdenas *et al.*, 2000). La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es un proceso altamente específico. Los FN's son los elementos determinantes más importantes en la especificidad bacteria-hospedero (Mergaert *et al.*, 1997). Los FN's son moléculas señal bacterianas de naturaleza lipo-quitooligosacárida (LCOs, *por sus siglas en inglés: Lipo-Chitin Oligosaccharides*). Aunque son producidos por la bacteria, se comportan como las hormonas vegetales: son señales que difunden y activan diversos procesos del desarrollo en la planta (Oldroyd and Downie, 2008). Todos los FN's caracterizados hasta la fecha consisten de un esqueleto oligomérico de tres a seis monómeros de *N*-acil-D-glucosaminas (GlcNAc) ligadas por enlaces β -(1-4), *N*-aciladas en el extremo no reductor del residuo glucosaminosil, con un ácido graso intrínseco o un ácido graso derivado simbiosis-específico. El azúcar del extremo terminal no reductor, puede ser sustituido en la posición C-2 por un ácido graso, cuya estructura es variable (Laeremans and Vanderleyden, 1998). *Rhizobium* produce varios FN's que presentan tres tipos de variaciones: la longitud del esqueleto de glucosamina (Fig. 2, $n=N$ -acetil glucosamina), la estructura del ácido graso (Fig. 2, R_1), y las decoraciones en el residuo del azúcar terminal (Fig. 2 R_{2-10}) (Geurts and Franssen, 1996).

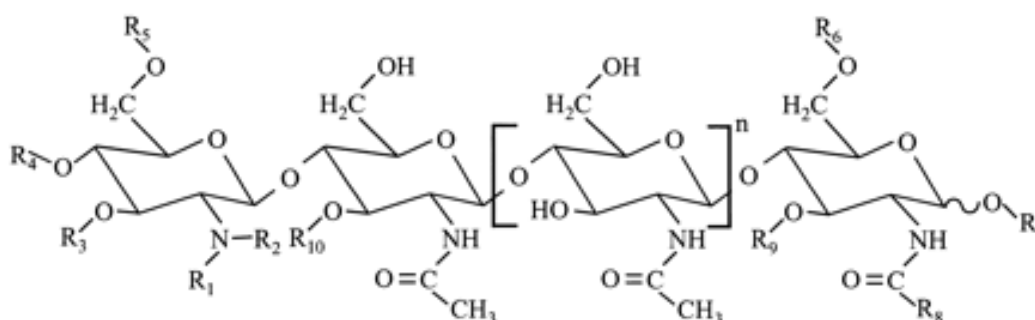


Fig. 2.- Estructura de los FN's. Estructura general de un lipo-oligosacárido producido por rhizobia. Las sustituciones en R_1 - R_{10} , y el grado de oligomerización (n , número de residuos de *N*-acetil glucosamina) le dan la identidad al FN (D'Haeze and Holsters, 2002).

La expresión de los genes *nod* bacterianos que intervienen en el establecimiento de la simbiosis se produce como consecuencia de que los flavonoides liberados por la planta son percibidos por la bacteria en donde interactúan con la proteína NodD que se encuentra en la membrana (Schlaman *et al.*, 1989). NodD es un factor de transcripción presente en casi todas las especies de rhizobia, que regula operones inducibles y estimula la transcripción de *nodABC* y de otros genes *nod* esenciales. La proteína NodD reconoce la caja *nod* presente en los promotores de los genes *nod*. Además, este promotor puede regular la expresión de otros genes *nod* en función del nitrógeno

presente. De esta forma, se puede conseguir un control fino de la expresión de genes bacterianos involucrados en la fijación de nitrógeno (Peck *et al.*, 2006).

Los genes *nod* estructurales comprenden genes que son específicos de cada Rhizobiácea y genes que son comunes en todas las especies de *Rhizobium*. Los genes *nodABC*, están presentes en todas las especies de *Rhizobium*, y son requeridos para la síntesis de la estructura principal de los FNs. NodC es una *N*-acetilglucosaminiltransferasa que sintetiza un quito-oligosacárido a partir de la UDP-*N*-acetil glucosamina; NodB es una quito-oligosacárido deacetilasa, que deacetila el extremo no reductor, y NodA está involucrada en la *N*-acilación del esqueleto amino-azúcar. Los genes *nod* específicos (*nod*, *nol* y *noe*) están involucrados en diversas sustituciones de los FNs con sustituciones que confieren especificidad al hospedero; estos genes codifican enzimas que están involucradas en la decoración del esqueleto quito-oligosacárido de los FNs con sustituciones que confieren la especificidad al hospedero (Roche *et al.*, 1996).

Algunos rhizobia producen más de una población de FNs con distintas combinaciones. Por ejemplo, *Rhizobium* sp. NGR234 produce FNs con ninguno, uno o dos grupos carbamoil, un ácido graso palmitoil o estearoil en el extremo no reductor y un 2-*O*-metilfucosil insustituible, sulfatado o acetilado en el extremo reductor (Mergaert *et al.*, 1997). Los genes de nodulación están generalmente localizados en un plásmido llamado *Sym*, en donde están organizados en operones y su transcripción está regulada por el gen *nodD* que se expresa constitutivamente y que es un miembro de la familia LysR (reguladores transcripcionales). NodD activa a los operones *nod* después de ser activada por los flavonoides liberados por la planta (Geurts and Franssen, 1996; Henikoff *et al.*, 1988). Los genes *nod* muchas veces se continúan expresando cuando *Rhizobium* es liberado en el nódulo y se diferencia en bacteroide. La especificidad también es controlada a nivel de rizósfera, ya que hay quitinasas y otras enzimas capaces de degradar selectivamente FNs determinados. De esta forma se logra también una especificidad de infección. La presencia de los FNs es imprescindible para que se lleven a cabo los cambios morfológicos y las respuestas tempranas de la infección, aunque su sola presencia no es suficiente para que se produzca la morfogénesis completa del nódulo.

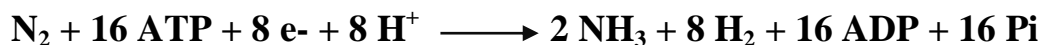
III.6 Nodulinas

Debido a que la interacción con *Rhizobium* es altamente benéfica para el crecimiento de las plantas leguminosas, estas evolucionaron un set de genes que codifican para proteínas específicas del nódulo, que son indispensables para el desarrollo y función de éste (Verma, 1992). Las nodulinas han sido subdivididas en dos clases, nodulinas tempranas y tardías en base a la etapa en la cual son detectados los transcritos. Los genes que codifican a nodulinas tempranas son activados en las raíces desde horas y hasta pocos días después de la inoculación con *Rhizobium*, y se propone que están involucradas en el desarrollo del nódulo. Los genes de nodulinas tardías son activados en nódulos maduros temporalmente cerca al inicio de la fijación de nitrógeno. Algunos de estos genes codifican para enzimas involucradas en el metabolismo primario del carbón y nitrógeno; otras, pueden ayudar a mantener la integridad estructural de los nódulos, incluyendo el confinamiento de los bacteroides en los simbiosomas (Colebatch *et al.*, 2002).

Muchas nodulinas tempranas son expresadas secuencialmente durante la infección y la diferenciación del nódulo. Por ejemplo, la expresión del gen *ENOD2* (*por sus siglas en inglés: Early Nodulin*) está relacionada con la diferenciación temprana y es inducido por altas concentraciones de citocininas. El gen *ENOD5* codifica para una proteína que es inducida durante la infección, pero solo es identificada en las células que forman parte de la punta del hilo de infección en crecimiento. También se han identificado dos genes cuya expresión es inducida en la epidermis de la raíz dentro de las 2-3 primeras horas después de la exposición a los FNs. Estos genes son *ENOD12*, que codifica a una proteína rica en prolinas, y *MtRip1* (*por sus siglas en inglés: Receptor Interacting Protein 1*), que codifica una peroxidasa. Ambos genes son expresados en todas las células epidérmicas en una zona específica de la raíz que se extiende del meristemo de la raíz al área de diferenciación del pelo radical. Estos genes pueden tener un papel importante en la infección. *ENOD12* también se identificó en el primordio nodular junto a *ENOD40* y *PrP4* (*por sus siglas en inglés: Pre- mRNA-Processing Factor 4*). La expresión de estos genes no ha sido identificada en otros primordios, lo cual hace al primordio nodular distinguible de otros (Geurts and Franssen, 1996). Los genes de nodulinas tardías son expresados desde la liberación de la bacteria del hilo de infección hasta antes de la inducción de la nitrogenasa y por ende de la fijación de nitrógeno (Verma and Delauney, 1988). La expresión de las nodulinas tardías puede continuar hasta la senescencia del nódulo, después de que la fijación haya cesado por completo.

III.7 Fijación Biológica de Nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente más importante requerido por las plantas, puesto que es un componente esencial de todos los aminoácidos y ácidos nucleicos y es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo. Sin embargo, la disponibilidad del nitrógeno está limitada en muchos suelos, y aunque la atmósfera terrestre consiste de 78.1% de gas nitrógeno (N₂), las plantas no tienen la capacidad de usar esa forma de nitrógeno (Ferguson *et al.*, 2010). La fijación biológica del nitrógeno atmosférico es una ruta metabólica de gran importancia que consiste en la reducción del N₂ a NH₄⁺. Las plantas leguminosas evolucionaron para llevar a cabo una relación simbiótica con bacterias Rhizobiáceas, en la cual el N₂ es convertido a amonio por los bacteroides y es subsecuentemente asimilado por la planta (Patriarca *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2008). Una vez que la simbiosis se ha establecido, la enzima nitrogenasa se encarga de llevar a cabo esta transformación dentro de los bacteroides en un proceso altamente dependiente de energía (Halbleib and Ludden, 2000). Esto es debido a que la nitrogenasa consume 16 moléculas de ATP por N₂ reducido para romper el triple enlace que une los dos átomos de nitrógeno, según la siguiente ecuación:



La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es la adaptación a un medio deficiente en nitrógeno. En suelos ricos en nitrógeno, las leguminosas prefieren utilizar el nitrógeno inorgánico del suelo, independientemente de la presencia de las bacterias. Por el contrario, si la bacteria está presente y los niveles de nitrógeno del suelo son bajos, la planta estimula la infección por *Rhizobium* en la raíz, para que se lleve a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico (Coronado *et al.*, 1995). Como la planta debe producir los compuestos carbonados, existe una relación directa entre fotosíntesis y fijación de nitrógeno. Por lo tanto, la fijación de nitrógeno se relaciona estrechamente a la producción de biomasa aérea y rendimiento (Vitousek *et al.*, 2002).

III.8 Hormonas en la Nodulación

Parte de la arquitectura vegetal se forma durante el desarrollo post-embrionario, y los cambios en las concentraciones de hormonas inducidos por factores bióticos y abióticos influyen en el desarrollo de células y órganos. La formación de los nódulos radicales es un ejemplo de este desarrollo post-embrionario, en donde las hormonas juegan un papel importante en la señalización secundaria (Stougaard, 2000). La nodulación es un proceso finamente regulado en las leguminosas. Este proceso permite asegurar los niveles apropiados de fijación de nitrógeno sin la excesiva pérdida de las reservas de carbono. Este balance es mantenido por la relación entre la nodulación y su regulación por hormonas vegetales (Ding *et al.*, 2008). En los nódulos de diversas leguminosas se pueden detectar auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico en concentraciones superiores a las existentes en las raíces no inoculadas. Los rhizobia producen auxinas, citocininas y giberelinas, pero no se conoce la medida en la que éstas contribuyen al balance hormonal del nódulo. Suministradas exógenamente, las fitohormonas pueden inhibir la formación de los nódulos, por lo que un posible papel inhibitorio para estos reguladores podría ser la autorregulación de la nodulación (Hirsh and Fang, 1994).

Algunas evidencias indican que las fitohormonas están involucradas en la organogénesis de los nódulos, y determinadas fitohormonas, o bien compuestos que bloquean el transporte de éstas (auxinas), inducen la formación de estructuras parecidas a nódulos (nódulos vacíos o pseudo-nódulos). Las hormonas vegetales que afectan la nodulación se pueden dividir en dos grupos: a) las que participan en regular positivamente la nodulación, es decir, que tienen una función positiva en el desarrollo del nódulo, como las citocininas, auxinas, giberelinas y brasinoesteroides; y b) aquellas que tienen un efecto negativo en la nodulación como el etileno, ácido jasmónico y ácido abscísico (Oldroyd and Downie, 2008).

III.8.1 Citocininas

Las citocininas están involucradas en la regulación de muchos procesos celulares durante el desarrollo de la planta (por ejemplo, el crecimiento y la adaptación a condiciones ambientales) (Martin *et al.*, 2000; Mok and Mok, 2001). La percepción de los FNs en la epidermis resulta en incrementos localizados de los niveles de citocininas, que inducen la organogénesis del nódulo en el córtex (Hirsch and Fang, 1994; Fang and Hirsch, 1998; Oldroyd, 2007). También se ha observado que la aplicación de citocininas a la raíz activa la división celular en el córtex, deposición de amiloplastos e inducción de nodulinas tempranas (Cooper and Long, 1994; Bauer *et al.*, 1996; Fang and Hirsch, 1998; Lorteau *et al.*, 2001). Mutantes de *Mezorhizobium meliloti* portadores del gen *tzs* (por sus siglas en inglés: Trans-Zeatín) de *Agrobacterium tumefaciens*, sobre-producen citocininas, e inducen la formación de nódulos vacíos que expresan ENOD2 en raíces de alfalfa. Un receptor de citocininas funciona en el córtex externo de la raíz, y es requerido para los eventos de división celular, este receptor tiene un dominio de cinasa de histidina y es codificado por *MtCRE1* (por sus siglas en inglés: Cytokinin Response 1)/*LjLHK1* (por sus siglas en inglés: Lotus Histidine Kinase 1). Mutaciones de ganancia de función en este receptor resultan en nodulación espontánea; mientras que el silenciamiento o pérdida de función, resulta en un dramático decremento en el número de nódulos (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006). El receptor de citocininas es crítico para el desarrollo del nódulo, lo que sugiere que las citocininas son componentes clave de la organogénesis del nódulo (Ferguson *et al.*, 2010).

III.8.2 Auxinas

Las auxinas participan en procesos celulares que ocurren durante la nodulación (por ejemplo, la división celular y la formación y diferenciación de los haces vasculares) (Ferguson and Mathesius, 2003). El desarrollo del nódulo requiere acumulación local de auxinas en la zona de iniciación del nódulo (Mathesius, 2008). Entre los aminoácidos que exuda la planta se encuentra el triptófano que es fácilmente convertido por *Rhizobium* en ácido indolacético (IAA, por sus siglas en inglés: 3-Indoleacetic Acid). Esto tiene una importancia crucial en la infección pues promueve el crecimiento y engrosamiento del pelo radical. Es decir, el IAA favorece la infección (Etesami et al., 2009). En especies de *Medicago* se observó un incremento en la nodulación cuando se inocularon con cepas de *R. leguminosarum* que sobre-producen IAA; sin embargo, no se observó el mismo efecto en *P. vulgaris*. Es interesante notar que solo se observó un efecto positivo en el incremento de la nodulación en nódulos indeterminados y no en el caso de nódulos determinados. Los nódulos indeterminados formados por *R. leguminosarum* que sobre-produce IAA, también mostraron niveles altos de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés: Nitric Oxide), que se sabe regula en conjunto con el IAA el desarrollo acelerado de raíces laterales. Por lo tanto, la síntesis de auxinas por *Rhizobium* y el NO regulan positivamente la formación de nódulos indeterminados (Pii et al., 2007).

Inhibidores del transporte polar de las auxinas, como el ácido naftiltalámico (NPA, por sus siglas en inglés: Naphthyl Phthalamic Acid), inducen la formación de pseudo-nódulos en las raíces de diferentes leguminosas y estas estructuras expresan diferentes nodulinas tempranas, ENOD2, ENOD12, ENOD40, etc. (Schultze and Kondorosi, 1998).

III.8.3 Etileno

El etileno es una hormona que se ha asociado con la respuesta de las plantas a heridas, ataque de patógenos, y otros tipos de estrés (Arshad and Frankenberger, 2002). Es posible que se haya desarrollado como un mecanismo para prevenir la utilización de fotoasimilados indispensables para el desarrollo del nódulo, mientras la planta está bajo estrés (Salah et al., 2008). Por lo tanto, el etileno es un regulador negativo de la nodulación. Este regula la nodulación en múltiples niveles: regula negativamente la sensibilidad de la planta a los FNs, inhibe la deformación de los pelos radicales, las oscilaciones de Ca^{2+} , la infección bacteriana, la expresión de nodulinas y el número de nódulos formados (Oldroyd et al., 2001). Esta regulación se lleva a cabo en un paso más temprano a la vía de transducción de señales de los FNs, temporalmente cerca de las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por los FNs.

III.8.4 Ácido jasmónico

El ácido jasmónico frecuentemente funciona en paralelo con el etileno regulando las mismas respuestas. Tiene la capacidad de regular la sensibilidad de las plantas a los FNs, y regula los mismos procesos que el etileno en las oscilaciones de Ca^{2+} . El ácido jasmónico no solo inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} , también suprime la frecuencia de las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por los FNs definiendo el periodo entre las oscilaciones cuando este es aplicado en bajas concentraciones (Sun et al., 2006).

III.8.5 Ácido abscísico

ABA (*por sus siglas en inglés: Abscisic Acid*) es típicamente considerado como un regulador negativo del desarrollo del nódulo y parece funcionar en la epidermis y el córtex (Ding and Oldroyd, 2009). La aplicación exógena de ABA en *Medicago truncatula* inhibe la nodulación, la infección bacteriana y la expresión de nodulinas. ABA actúa de forma similar al ácido jasmónico y al etileno regulando la señalización de los FNs y afectando la naturaleza de las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por ellos; pero no usa la misma vía de señalización del etileno. ABA suprime la señalización de los FNs en la epidermis y regula la inducción del primordio nodular en el córtex de la raíz. En este proceso ABA regula la señalización de los FNs en la epidermis, y la división celular inducida por citocininas en el córtex. Además, la inhibición de la señalización de ABA, permite un fenotipo de hiper-nodulación, por lo tanto, ABA tiene la capacidad de regular coordinadamente las diversas vías de desarrollo asociadas a la formación del nódulo y puede dictar la respuesta natural de las plantas a la bacteria simbiótica (Ding *et al.*, 2008).

III.9 Temperatura

La temperatura afecta a la simbiosis de modo indirecto a través de los procesos metabólicos de la planta como respiración, fotosíntesis, transporte y transpiración. En las leguminosas estudiadas, que tienen un ciclo de Calvin normal, su temperatura óptima es de 15 a 20°C. Las temperaturas altas en las raíces afectan la infección por *Rhizobium* y por tanto la fijación de nitrógeno en varias especies de leguminosas. La temperatura crítica para la fijación de nitrógeno es de 30°C para trébol y chícharo, y de 35° a 40°C para soya, cacahuate y Vigna. La función del nódulo en frijol común es óptima entre 25 y 30°C y es obstaculizada por temperaturas en la raíz de 30 a 33°C. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los rhizobia es 30°C (Michiels *et al.*, 1994). La respiración se incrementa con las altas temperaturas, esto hace que haya una menor disponibilidad de carbono para la simbiosis. En el caso extremo de altas temperaturas, se reduce el número de raíces laterales y pelos radicales, haciendo que la probabilidad de nodulación sea menor. A temperaturas extremas tiene lugar la degradación de los nódulos (Schweitzer and Harper, 1980).

III.10 Salinidad

La salinidad no afecta la colonización de las raíces por *Rhizobium* pero retarda la iniciación o crecimiento de nuevos nódulos, y también reduce la eficiencia de nódulos ya formados los cuales se desarrollan más tempranamente en condiciones normales. *Rhizobium* es más tolerante a la salinidad que la planta, lo que sugiere que la tolerancia a la salinidad es dictada por el hospedero. La sal induce un estado oxidante ya que se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species*) en donde actores importantes de la producción de ROS son las NADPH oxidasas (*por sus siglas en inglés: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase*), o Rboh en plantas (Rao *et al.*, 2002; Sagi and Fluhr 2006).

III.11 Luz

La luz afecta a la simbiosis a través de la fotosíntesis, controlando la cantidad de carbohidratos para el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Existen evidencias de algunos efectos directos de la luz sobre la nodulación; por ejemplo, la nodulación disminuye bajo luz azul, mientras que con la luz roja la inhibición es mayor (esto aporta una evidencia de la implicación del fitocromo en el proceso de nodulación) (Malik *et al.*, 1984). La obscuridad continua, interfiere con la función del nódulo e induce la senescencia prematura del nódulo (Matamoros *et al.*, 1999, Swaraj *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2010).

III.12 Señalización en la Nodulación

La formación del nódulo implica una compleja progresión de eventos de diferenciación/de-diferenciación celular regulados espacial y temporalmente y que involucran varios tejidos de la raíz (Patriarca *et al.*, 2004). La cascada de señalización que da lugar a la nodulación es parte del sistema de percepción/transducción de los FNs que son moléculas señal. A pesar de la importancia de este proceso que permite a las leguminosas fijar nitrógeno, aún no se conocen todos los componentes que permiten que se lleven a cabo los mecanismos requeridos para dar lugar a la nodulación, por lo cual, es relevante investigar cuáles son los elementos moleculares que participan en la formación del nódulo. Los productos de los genes que son expresados exclusivamente en nódulos se conocen como nodulinas, y es de esperarse que sus funciones estén relacionadas con la función del nódulo. Entre éstos se encontraron genes involucrados en la degradación y glicólisis de la sacarosa, reciclaje de CO₂, síntesis de aminoácidos, transporte a membrana, metabolismo de hormonas, síntesis de proteínas y pared celular, transducción de señales y regulación de la transcripción (Colebatch *et al.*, 2002).

III.12.1 Receptores

El modelo actual de la percepción de los FNs propone la participación de dos receptores tipo cinasas o RLK's (*por sus siglas en inglés: Receptor-Like Kinase*) localizados en las células epidérmicas y que están involucrados en la unión de los FNs. Las proteínas identificadas por medio de análisis de mutantes que no perciben a los FNs incluyen características clásicas de una familia grande de RLKs, que presentan uno o más dominios extracelulares con repeticiones ricas en leucinas o LRR (*por sus siglas en inglés: Leucine Rich Repeat*), y un dominio intracelular con identidad a cinasas de ser/treo. Diversos receptores que participan en la nodulación se han identificado en *L. japonicus*: HAR1 (*por sus siglas en inglés: Hypernodulation Aberrant Root 1*) (Krusell *et al.*, 2002), SYMRK (*por sus siglas en inglés: Symbiosis Receptor Kinase*) (Stracke *et al.*, 2002), NFR1/5 (*por sus siglas en inglés: Nod Factor Receptor 1 y 5*) (Radutoiu *et al.*, 2003); en *M. truncatula*: NFP (*por sus siglas en inglés: Nod Factor Perception*) (Amor *et al.*, 2003), LYK3/4 (*por sus siglas en inglés: LysM Domain-Containing Receptor-Like Kinases*) (Limpens *et al.*, 2003), DMI2 (*por sus siglas en inglés: DOESN'T MAKE INFECTION 2*) (Catoira *et al.*, 2000); en *M. sativa*: NORK (*por sus siglas en inglés: Nodulation Receptor Kinase*) (Endre *et al.*, 2002); y en *P. sativum*: SYM2/10/19 (*por sus siglas en inglés: SYMBIOSIS 2, 10 y 19*) (Walker *et al.*, 2000). NFR1 y 5 pertenecen a la familia de LysM, que son proteínas que inicialmente se identificaron en bacterias y que tienen la capacidad de reconocer polisacáridos

especializados, como el peptidoglicano, la quitina, etc., por lo que no es de extrañarse que puedan reconocer los polisacáridos derivados de los FNs (Radutoiu *et al.*, 2003). El dominio intracelular del carboxilo terminal de las proteínas *LjNFR5*, *MtNFP* y *PsSYM10*, es una cinasa de serina/treonina atípica, ya que carece del asa de activación que usualmente regula la actividad de cinasa. Por lo tanto, las cinasas de este tipo son activadas probablemente de una forma que no es la convencional para cinasas de serina/treonina. La región extracelular contiene tres dominios LysM, y estos LysM-RKs son, por lo tanto, buenos candidatos para unirse a los FNs, los cuales contienen un esqueleto de *N*-acetilglucosamina (Madsen *et al.*, 2003). Se postula que *LjNFR1*, *MtLIK3/4* y *PsSYM2* forman un complejo heterodimérico con *LjNFR5*, *MtNFP* y *PsSYM10* para formar el receptor principal de los FNs, y que *MtDMI2*, *LjSYMRK*, *PsSYM19* y *MsNORK* actúan corriente abajo del heterodímero. *NFR1* es un gen epistático de otros tres genes que participan en la nodulación: *LjNIN/PsSYM35* (por sus siglas en inglés: NODULE INCEPTION), *ENOD2* y *SYMRK* (Oldroyd and Downie, 2004).

III.13 RACK1

Para las vías de transducción de señales las proteínas adaptadoras son indispensables ya que permiten transducir y amplificar las señales acoplándose a varias proteínas al mismo tiempo. Las proteínas adaptadoras deben su habilidad a la presencia de dominios, que les permiten unirse selectivamente a otras proteínas y llevar estos complejos a sitios blanco de acción de las proteínas efectoras. La formación de complejos depende de la naturaleza y la cantidad de dominios que presente una proteína en particular. En las células eucariotas se integran múltiples señales a través de la proximidad organizada de moléculas señalizadoras por medio de éstas proteínas adaptadoras. Las proteínas adaptadoras ensamblan complejos activos con múltiples proteínas señalizadoras/enzimas de la misma o de diferentes vías para facilitar la interacción y regulación de las redes de transducción de señales. Las proteínas adaptadoras han demostrado ser elementos centrales para un creciente número de vías de señalización (Schechtman and Mochly-Rosen, 2001).

RACK1 (por sus siglas en inglés: Receptor for Activated C Kinase 1) es una proteína que presenta 7 dominios WD-40 que le confieren la estructura de β -propela. La estructura β -propela es una plataforma común para integrar varias señales. Las repeticiones WD-40 están involucradas en la interacción proteína-proteína, y la estructura β -propela permite a las proteínas formar complejos reversibles con sus proteínas ligando. Hay evidencia que permite sugerir que los dominios de interacción, tales como la β -propela, han sido evolutivamente seleccionados por su flexibilidad, su habilidad para ensamblar máquinas multiproteicas, y su potencial para mediar sofisticadas funciones biológicas (Fulop and Jones, 1999; Pawson and Nash, 2003). Esta estructura sirve de andamio para muchas otras proteínas durante los procesos de señalización. RACK1 de animales está principalmente involucrada en la transducción de señales de la vía de la PKC (por sus siglas en inglés: Protein Kinase C). En sistemas vegetales se han identificado proteínas homólogas a RACK1 de animales; sin embargo, su función aún no ha sido caracterizada. RACK1 representa un modelo de estudio de gran importancia ya que la capacidad que tiene de formar complejos multiproteicos para transducir las señales, puede ser utilizada para identificar y caracterizar vías de señalización en sistemas poco estudiados como lo es la nodulación. RACK1 es una proteína de andamiaje muy versátil que en sistemas animales se une a una gran variedad

de ligandos de forma regulada y que participa activamente en diversas vías de transducción de señales. En plantas se ha observado que media múltiples respuestas hormonales y procesos del desarrollo (Chen *et al.*, 2006), regula la producción de ROS y participa en la inmunidad innata en arroz (Nakashima *et al.*, 2008), y también forma parte del ribosoma. La característica de esta proteína de formar complejos multiproteicos en vías de señalización diversas le hace una proteína de interés para caracterizar vías de señalización en sistemas poco estudiados.

Originalmente identificada en mamíferos como una proteína de anclaje de PKC, que conduce a la enzima activa a diferentes sitios celulares, RACK1 es ahora vista como una proteína de andamio versátil, que puede unir numerosas moléculas señalizadoras de diversas vías de transducción de señales en una forma regulada. Algunos ejemplos recientes incluyen la señalización de cAMP (*por sus siglas en inglés: Cyclic Adenosine Monophosphate*) (Yarwood *et al.*, 1999; Steele *et al.*, 2001), control del ciclo celular (Mamidipudi *et al.*, 2004), liberación de Ca²⁺ (Patterson *et al.*, 2004), ensamblaje del ribosoma y regulación de la traducción (Ceci *et al.*, 2003, Nilsson *et al.*, 2004; Sengupta *et al.*, 2004), remodelación del citoesqueleto (Osmanagic-Myers and Wiche, 2004), y degradación del proteosoma (Fomenkov *et al.*, 2004).

RACK1 es una proteína altamente conservada que se encuentra tanto en animales como en plantas. La posición de las repeticiones WD de RACK1 están conservadas en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* que divergió de un predecesor del reino vegetal hace mil millones de años, indicando que la función biológica de RACK1 es arcaica (Neer *et al.*, 1994; McCahill *et al.*, 2002). Aunque no fue reconocida como tal, el primer homólogo de RACK en plantas fue identificado en células en suspensión BY-2 (*por sus siglas en inglés: Bright Yellow 2*) de tabaco como un gen inducido por auxinas, *arcA* (*por sus siglas en inglés: Auxin-Regulated Gene From Cultured Cells*) (Ishida *et al.*, 1993); y después en *Arabidopsis*, *AtarcA*; arroz, *RWD* (*por sus siglas en inglés: Rice Protein Containing the WD-40 Repeat*) (Iwasaki *et al.*, 1995); soya, *G_β-like* (*por sus siglas en inglés: G Protein β like*) (Nielsen *et al.*, 2001); alfalfa *Msgb1* (*por sus siglas en inglés: Medicago sativa G protein β like*) (McKhann *et al.*, 1997); tomate, *LeArcA* (Kiyosue and Ryan, 1999); y *Brassica napus BGB1* (*por sus siglas en inglés: Brassica G Protein Beta Subunit 1*) (Kwak *et al.*, 1997). Hay evidencia que sugiere que RACK1 de plantas puede estar involucrada en la división celular controlada por hormonas, respuestas a luz UV y ácido salicílico (Ishida *et al.*, 1993; McKhann *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2006), en la inmunidad innata (Nakashima *et al.*, 2008) y regulación de la traducción (Nilsson *et al.*, 2004). La información de RACK1 en plantas ha incrementado durante los últimos años; sin embargo, esta información aun no es suficiente para asignarle una función específica.

La nodulación es un proceso post-embrionario complejo, en el cual se activan los mecanismos de respuesta a *Rhizobium*. Estas respuestas incluyen la reorganización celular, cambios en la concentración de segundos mensajeros como Ca²⁺ y ROS, endocitosis y exocitosis, modulación hormonal, expresión de nodulinas, etc. Las proteínas de andamio son elementos clave que modulan e integran las vías de señalización dentro de un contexto común, como lo es la organogénesis del nódulo. RACK1 representa un modelo de estudio ideal de gran importancia, y la capacidad que tiene de formar complejos multiproteicos para transducir las señales puede ser utilizada para identificar y caracterizar vías de señalización en sistemas poco estudiados como la nodulación en *P. vulgaris*.

IV. ANTECEDENTES

Cada vez se conoce más información referente a los procesos involucrados en el metabolismo celular de las plantas; más aún, ahora se conocen algunos de los componentes de las vías de señalización que participan en su desarrollo; interesantemente, la existencia de sus contrapartes homólogas en sistemas animales y otros eucariotes, ha permitido inferir algunas de sus funciones.

De la misma forma, la función que RACK1 desempeña en plantas podría ser similar a la de RACK1 en animales; por ejemplo, cuando BGB1 de *B. napus* es expresada en oocitos de *Xenopus laevis*, se inhibe la maduración de los oocitos que es mediada por insulina. Esta vía de maduración a su vez es mediada por PKC, y la inhibición va acompañada de la reducción de PKC en la fracción membranal, fenómeno que se ha observado cuando se sobre-expresa RACK1 en mamíferos. Estos datos indican que BGB1 comparte algunas características funcionales comunes con RACK1 de mamíferos, sugiriendo que algunos procesos celulares relacionados a RACK1 podrían operar de manera análoga en plantas (Kwak *et al.*, 1997). Por otro lado, estas proteínas también están involucradas en la vía de transducción de señales mediadas por hormonas, como se mencionó previamente *arcA* de tabaco responde a auxinas; adicionalmente, *Msgb1* de *M. sativa* es inducida cuando las raíces son tratadas con citocininas y participa en la división celular del primordio y meristemas que darán lugar a los nódulos en respuesta a *S. meliloti* (McKhann *et al.*, 1997).

Los homólogos de RACK1 en plantas carecen de expresión tejido-específica. El transcrito de *arcA* de tabaco se encuentra en niveles más altos en raíces, pero también se detectó en hojas jóvenes y maduras, flores, meristemo apical y tallos, y también está presente en altos niveles en células en suspensión (Ishida *et al.*, 1993). El homólogo de arroz se analizó en hojas y raíces, observándose que la acumulación de su RNA es mayor en raíz. Aunque no se conocen datos de los patrones de expresión del homólogo de *B. napus*, se sabe que el cDNA fue aislado de raíces adultas. En *M. sativa* se observó que el RNA se acumula en casi todos los tejidos (raíz, hoja, tallo, flor, en células de nódulos, nódulos de 20 días, y durante la maduración del embrión). En *Arabidopsis* se observa expresada ubicuamente pero con mayor presencia en meristemas del brote, y raíces primarias y laterales (Chen *et al.*, 2006); sin embargo, los niveles de RNA fueron mucho más altos en embriones jóvenes y en el meristemo y primordio del nódulo. Es notorio que la expresión de los homólogos de plantas se correlaciona con sitios de división celular activa, lo que hace evidente que estas proteínas vegetales pueden estar involucradas en procesos relacionados con la división celular.

En plantas no se han identificado genes para PKC hasta el momento, sin embargo, la existencia de homólogos a *RACK1* sugieren la presencia de proteínas similares a esta cinasa y a sus otros ligandos en plantas (Guo *et al.*, 2011).

En un trabajo previo (Islas-Flores *et al.*, 2009), se identificó una proteína de 36 kDa (975 pb's) en ejes embrionarios de *P. vulgaris*. Esta proteína tiene 96% de identidad con la proteína tipo G_{β} de soya (la probable subunidad beta de una proteína G heterotrimérica) y *Msgb1* de *M. sativa*; 85% de identidad con *arcA* de *Arabidopsis*; 83% de identidad con *arcA* de *N. tabacum*; y 67% de identidad con RACK1 de ratón y humano, por lo cual se le nombró *PvRACK1*. En la secuencia de *PvRACK1* se

identificaron 7 repeticiones WD-40 y dos péptidos que en animales son indispensables para la unión de RACK1 a PKC. Se determinó que *PvRACK1* esta representada por una familia génica pequeña de uno o dos miembros en el genoma de *P. vulgaris* (por Southern blot). Para obtener anticuerpos específicos contra *PvRACK1*, se sintetizó un péptido del extremo amino de la proteína (AIATPIDNSD), y se expresó un fragmento de 580 pb's (del extremo 3' del cDNA de *PvRACK1*) en células de *E. coli*. El péptido sintetizado y la proteína recombinante se utilizaron para producir anticuerpos policlonales en conejo, y ambos anticuerpos reaccionaron con la proteína recombinante sobre-expresada en bacterias. Los anticuerpos, la sonda de cDNA y el fragmento de cDNA expresado en *E. coli* son herramientas fundamentales que permiten ahondar en el estudio de esta proteína.

El hecho de que RACK1 pudiera compartir funciones entre plantas y animales y también ser un regulador directo en el ciclo celular, la sitúa como una proteína de interés para estudiar su función en las vías de señalización en procesos de proliferación celular. Para el estudio de su participación en estas vías, la organogénesis del nódulo ofrece un modelo de estudio interesante para analizar los procesos involucrados en la señalización celular y el control del crecimiento en plantas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Material Biológico

Se utilizaron embriones de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Negro Jamapa y de *Glycine max* L. Merrill, así como semillas de *Pisum sativum* L. Las semillas de frijol y soya fueron esterilizadas por dos métodos: a) se incubaron 5 min con 0.6% hipoclorito de sodio, se enjuagaron con agua tridestilada abundante, enseguida se incubaron por 1 min con 96% etanol y se enjuagaron de nuevo; y b) se pusieron con gas cloro (97 ml 6% hipoclorito de sodio con 3 ml 33-40% HCl) en una cámara con vacío por 12 h. Para inducir la nodulación, se inocularon plantas de *P. vulgaris* con la cepa *R. tropici* CIAT 899 (DS-RED y GFP). Las plantas compuestas se obtuvieron mediante la transformación con *Agrobacterium rhizogenes*.

V.2 Extracción de Proteínas Solubles

Las semillas, ejes embrionarios, raíces, hojas, tallos, vainas y nódulos colectados fueron congelados en nitrógeno líquido y macerados hasta hacer una harina que fue resuspendida en buffer PBS 1X (*por sus siglas en inglés: Phosphate Buffered Saline*; 0.14 M NaCl, 0.0014 M NaH₂PO₄, 0.0036 M Na₂HPO₄, pH 7.5), adicionado con un coctel comercial de inhibidores de proteasas (Complete™), en una relación de 0.05 g de harina por 250 µl de PBS. La resuspensión se incubó por 5 min en agitación continua a 4°C. Cuando la mezcla quedó totalmente hidratada y bien resuspendida, se centrifugó a 15,000 g para eliminar el material insoluble. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20 °C hasta su análisis.

V.3 SDS-PAGE y Electrotransferencia

Los extractos de proteína en PBS 1X fueron analizados por electroforesis en geles de 12% de poliacrilamida desnaturalizante. Cada extracto de proteína fue diluido en proporción 1:1 con una solución de Laemmli 2X (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% [p/v] dodecil sulfato de sodio (SDS), 20% [v/v] glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol, 0.2% [p/v] azul de bromofenol) (Laemmli, 1970), e incubado 5 min a 95°C. Las proteínas se separaron en geles discontinuos con 25 mA de corriente constante por 1 h con 20 min.

Después de separar las proteínas en el gel, este se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C™ extra; AMERSHAM), y se transfirió en una cámara de transferencia mediante una corriente eléctrica a 300 mA de corriente constante durante 2 h de acuerdo a Towbin *et al.*, (1979).

V.4 Inmunodetección

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se pusieron en una solución de bloqueo de 3% BSA (*por sus siglas en inglés: Bovine Serum Albumin*) disuelta en 1X PBS y se incubaron con esta solución durante 1 h a 50°C. Entonces, se adicionó el anticuerpo primario anti-PvRACK1 hecho en conejo, diluido en una solución de 1X PBS y 0.05% Tritón X-100 (PBS-T) en relación 1:2000, y se incubó durante toda la noche en agitación a 4°C. Se hicieron tres lavados de 15 min en agitación continua con PBS-T, y se adicionó el anticuerpo secundario hecho en cabra,

asociado con fosfatasa alcalina en relación 1:3600. Con el anticuerpo secundario se incubó por 2 h a temperatura ambiente en agitación. Por último, se repitió el lavado tres veces con PBS-T en agitación por 15 min y una última vez con PBS 1X. Para revelar las proteínas a las que se unieron los anticuerpos, las membranas se pusieron por 1 min en una solución premezclada de BCIP/NBT (*por sus siglas en inglés: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitroblue Tetrazolium*; SIGMA). Para detener la reacción de revelado, se hicieron enjuagues con PBS 1X, pH 5.

V.5 Extracción de RNA

Para llevar a cabo la extracción de RNA, se colectaron los tejidos y fueron congelados inmediatamente con nitrógeno líquido. Las muestras de RNA que se utilizaron para llevar a cabo las reacciones de PCR y RT-PCR en tiempo real fueron extraídas por el método de tiocianato de guanidina con algunas modificaciones (Chomczynski and Sacchi 1987), y con el método del fenol caliente (Pawlowski *et al.*, 1994). La concentración de RNA se determinó con el espectrofotómetro NANODROP 2000c (Thermo Scientific).

V.6 Tratamiento Hormonal

Para analizar si los niveles de expresión de *PvRACK1* se modifican con cambios en los niveles hormonales, se trataron raíces de frijol con distintas hormonas, y se cuantificaron los niveles de expresión de *PvRACK1*. Para el tratamiento hormonal, se usaron semillas de *P. vulgaris* esterilizadas con gas cloro. Se germinaron durante 4 días en toallas de papel húmedas, y las plántulas fueron transferidas a medio hidropónico con solución B&D (Broughton and Dilworth, 1971) suplementada con 8 mM KNO₃, a una temperatura de entre 22-25°C. A los 3 días, se adicionaron las hormonas (25 µM IAA, 10 µM ABA, 25 µM Citocininas, y 10 µM GA₄), y posteriormente, a los 3 y 6 días se cambió la solución para mantener constante la concentración de las hormonas. Se colectaron raíces de 1, 3, 6 y 9 días de tratamiento hormonal, y se guardaron a -70°C hasta su análisis.

V.7 Construcciones para Silenciar y Sobre-expresar a *PvRACK1*

Para llevar a cabo el silenciamiento y la sobre-expresión de *PvRACK1*, se llevó a cabo la generación de las respectivas clonas de entrada. Para el silenciamiento de *PvRACK1*, se amplificó un fragmento de 520 pb's del extremo 5' de *PvRACK1*; para esto se diseñaron los oligonucleótidos: 5' CACCATGGCGGAAGGACTCGTCCTGAAGG 3' y 5' TACGGTCCCAAGATGCA 3'. Los cuatro nucleótidos (CACC) antes del ATG de la secuencia son indispensables para que la clonación se lleve a cabo direccionalmente en el vector de entrada. Para sobre-expresar a *PvRACK1* se amplificaron los 975 pb's del marco de lectura de *PvRACK1*. Los oligonucleótidos que se usaron tienen la siguiente secuencia 5'CACCATGGCGGAAGGACTCGTCCTG3', y 5'CTAATAACGTCCAATTGCCCAAACCTCTGACC3'.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima Vent polimerasa (NEW ENGLAND BIOLABS). Ambos fragmentos fueron ligados en el vector pENTR/D-TOPO (INVITROGEN), y secuenciados para verificar la correcta orientación y fase de estos en los plásmidos resultantes.

V.7.1 Clonaciones

Las reacciones de clonación consistieron en mezclar: 5 ng de producto de PCR; 200 mM NaCl-10 mM MgCl₂, 15-20 ng vector, y H₂O a 6 µl finales. Esta mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente, y entonces se adicionaron 2 µl a un vial de células TOP10 (pENTR/D) y DH5α (pTDT-RNAi y pH7FWG2). Para la transformación de células químicamente competentes, estas se incubaron 30 min a 4°C y se pasaron a 42°C por 45 seg. Inmediatamente después, se incubaron a 4°C por 1 min, entonces se adicionaron 250 µl de medio nutritivo SOC (*por sus siglas en inglés: Super Optimal Broth with Catabolite Repression*) a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C por 2 h con agitación a 250 rpm en una agitadora (INCUBATOR-SHAKER, LAB-LINE®).

Para la transformación de células electrocompetentes, se adicionó a la mezcla 50 mM NaCl-2.5 mM MgCl₂. La mezcla se pasó a una celda de electroporación fría, y se dio un pulso de 200 Ω, 125 µFD y 1.6 V en un electroporador. Rápidamente se añadieron a la celda 250-500 µl de medio LB o SOC, y se incubó por 2 h a 37°C en agitación. Después de las transformaciones se sembraron 200 µl de suspensión de bacterias en una caja Petri con medio LB suplementado con el antibiótico respectivo y se incubó toda la noche a 37°C. Se seleccionaron las clonas que llevan el inserto por medio de PCR en colonia con oligonucleótidos específicos para *PvRACK1*. La orientación del inserto se confirmó por digestión con enzimas de restricción.

V.7.2 Recombinaciones

Para llevar a cabo las reacciones de recombinación de la clona de entrada con los vectores destino (pTDT-RNAi y pH7FWG2), se mezclaron: 150 ng de la clona de entrada, 150 ng vector destino, 2 µl LR Clonasa (INVITROGEN) y Buffer TE, pH 8 hasta 10 µl finales. Esta mezcla se incubó toda la noche a 25°C. Entonces se adicionó 1 µl de proteinasa K y se incubó a 37°C por 10 min para detener la reacción. Se adicionaron 2.5 µl de la reacción de recombinación para transformar células TOP10 químicamente competentes. La selección de las clonas transformadas se hizo con espectinomicina (100-250 µg/ml), y la selección de las clonas que tienen el inserto se llevó a cabo por PCR y secuenciación.

V.8 Transformación de *A. rhizogenes* K599

Para transformar la cepa K599 de *A. rhizogenes* se añadió 150 ng del plásmido pTDT-RNAi-520 pb's o pH7FWG2-*PvRACK1* a un vial de células de *A. rhizogenes* K599. Esta mezcla se electroporó e inmediatamente se le añadieron 500 µl de medio LB a temperatura ambiente. El vial de transformación se incubó por 2 h a 30°C y las transformaciones posteriormente fueron sembradas en medio LB suplementado con 300 µg/ml de espectinomicina. La selección se llevó a cabo por medio de PCR en colonia.

V.9 Transformación de Plantas de Frijol con *A. rhizogenes* K599

El frijol es una planta que ha mostrado ser un desafío importante para la investigación genómica puesto que ha sido muy complicado transformarla genéticamente. El método de transformación de frijol con *A. rhizogenes* para inducir la formación de raíces pilosas permite obtener plantas compuestas de frijol con raíces transgénicas (**Estrada-Navarrete**

et al., 2007), lo que supone una herramienta para el análisis genético de proteínas de interés. Para obtener plantas compuestas se utilizaron 3 métodos de transformación:

Método de transformación 1.- El método de transformación 1 diseñado por Estrada-Navarrete *et al.*, (2007), consiste en germinar semillas de frijol directamente en vermiculita estéril humedecida con solución enriquecida B&D-KNO₃. Las plántulas de 6-7 días fueron inoculadas haciendo una pequeña herida con la punta de una aguja para insulina en la zona cotiledonaria, y colocando cuidadosamente una gota del inóculo de *A. rhizogenes* K599-pTDT-RNAi-520 pb's o *A. rhizogenes* K599-pH7FWG2-PvRACK1. Las raíces peludas fueron visibles desde los 7 días post-inoculación para *A. rhizogenes* K599-pH7FWG2-PvRACK1, y a los 10 días post-inoculación en el caso de *A. rhizogenes* K599-pTDT-RNAi-520 pb's. A los 15 días post-inoculación se cortó la raíz primaria de las plantas dejando solo las raíces "peludas"; al tercer día se inoculó con *R. tropici* CIAT899, se regaron cada tercer día con solución nutritiva B&D sin nitrógeno por 26 días.

Método de Transformación 2.- Para llevar a cabo el silenciamiento de la expresión de PvRACK1, se llevó a cabo un método de transformación que consistió en poner a germinar 10 semillas de frijol en cajas Petri redondas con medio Fahraeus (Fahraeus, 1957) inoculado con *A. rhizogenes* K599-pTDT-RNAi-520 pb's en agitación por 3 días en un cuarto de crecimiento vegetal. Después de este tiempo, se lavaron las plántulas con medio Fahraeus y se incubaron 3 días más en el mismo medio inoculado con *R. tropici* CIAT899. Las plántulas se transfirieron a macetas con vermiculita húmeda y se regaron cada tercer día con solución nutritiva B&D sin nitrógeno por 26 días.

Método de Transformación 3.- Este método consistió en germinar las semillas de frijol por 2 días e inocularlas en la base de los cotiledones. Las plántulas se transfirieron a medio hidropónico en solución B&D sin nitrógeno. De esta manera, las raíces transgénicas se desarrollan de forma más rápida y la raíz primaria puede ser cortada 5 días después de la transformación con *A. rhizogenes*. Cuando se eliminó la raíz primaria se inocularon las raíces transgénicas con *R. tropici* CIAT 899/DS-RED (para el caso de la sobre-expresión) o CIAT 899-GFP (para el caso del silenciamiento).

V.10 Análisis de Nódulos y Raíces Transgénicas

Las raíces transgénicas control (inducidas por *A. rhizogenes* K599 sin vector), las raíces transgénicas silenciadas (inducidas por *A. rhizogenes* K599-pTDT-RNAi-520 pb's) y las raíces transgénicas sobre-expresantes (inducidas por *A. rhizogenes* K599-pH7FWG2-PvRACK1) se inocularon con cepas de *R. tropici* CIAT 899 (DS-RED o GFP). A los 26 dpi se colectaron raíces y nódulos que fueron analizados con el microscopio confocal para identificar por fluorescencia el reportero "proteína roja tomate" (para el silenciamiento), o GFP (para la sobre-expresión) y de esta forma determinar cuáles de las raíces y nódulos llevan la construcción que silencia o sobre-expresa a PvRACK1. Además se colectaron nódulos y raíces para la extracción de RNA total, microscopía confocal y microscopía electrónica. Los nódulos colectados para extracción de RNA, fueron congelados en nitrógeno líquido y guardados a -70°C hasta su uso. En el caso de microscopía confocal y microscopía electrónica, los nódulos fueron procesados de distinta manera de acuerdo a las necesidades y protocolo de cada método.

V.11 PCR Y RT-PCR en Tiempo Real

Para el análisis cuantitativo de los niveles de mRNA de *PvRACK1*, se extrajo RNA total de los tejidos congelados a -70°C . Después, el RNA fue tratado con DNasaI (INVITROGEN), y la concentración fue determinada con un espectrofotómetro NANODROP 2000c (THERMO SCIENTIFIC). Para el qRT-PCR de *PvRACK1* en los tejidos (nódulo, raíz, tallo, hoja y vaina), durante la nodulación, los niveles de silenciamiento y sobre-expresión; 100 ng de RNA total fueron mezclados con iScript™ One-Step RT-PCR kit con SYBR® Green (BIO-RAD). Para el qRT-PCR de *PvRACK1* en raíces tratadas con hormonas, se sintetizó cDNA con RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Sintesis kit (FERMENTAS LIFE SCIENCES WALTHAM MA, USA), y se mezclaron 50 ng de cDNA con Maxima™ SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (FERMENTAS LIFE SCIENCES). En cada reacción se usó 10 μM de cada oligonucleótido. Para *PvRACK1*, se usaron los oligonucleótidos 5'-CTGCACTCCAGTTCAAACCTCG-3' (forward) y 5'-GAGCAGAGCATCAAGATCTGG-3' (reverse), que amplifican un fragmento de 150 pb's; y para *PvEF1*, 5'-GGTCATTGGTCATGTCGACTCTGG-3' (forward) y 5'-GCACCCAGGCATACTTGAATGACC-3' (reverse) que amplifican un fragmento de 150 pb's. Los oligonucleótidos para *PvEF1* fueron diseñados en base a un EST reportado en el GenBank con número de acceso CV530481. Las reacciones de PCR y RT-PCR cuantitativo se hicieron por triplicados en un qPCR-iQ5 or CFX96™ Real Time System C1000™ Thermal Cycler (BIO-RAD). Para los qPCRs se llevaron a cabo 3 repeticiones técnicas y 2 repeticiones biológicas.

V.12 PCR Genómico

Por medio de un análisis por Southern blot, se determinó que *PvRACK1* esta representada por una familia génica pequeña en el genoma de *P. vulgaris* (Islas-Flores *et al.*, 2009). Sin embargo, este análisis no es suficiente para concluir cuántos genes codifican para *PvRACK1*. Con la finalidad de obtener más información al respecto, se hizo un PCR genómico. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del estuche de INVITROGEN AccuPrime™ SuperMix II.

Las condiciones de la reacción fueron:

- 1.- Se incubaron los tubos durante 2 min a 94°C .
- 2.- Se realizaron 35 ciclos de amplificación con el siguiente protocolo:

Desnaturalización:	94°C por 15 seg
Alineamiento:	$55-60^{\circ}\text{C}$ por 15 seg
Extensión:	68°C por 3 min

V.13 Genome Walker

La secuencia del promotor de *PvRACK1* es una herramienta útil para entender cómo se regula su expresión, y en que procesos participa. Para obtener la secuencia del promotor de *PvRACK1* se utilizó un banco de promotores digerido con las enzimas *EcoRV*, *PvuI*, *StuI* y *DraI*. A los fragmentos derivados de las digestiones, se les colocó un adaptador en el extremo 5' para facilitar su amplificación con oligonucleótidos específicos. Para amplificar el promotor de *PvRACK1*, se utilizaron dos oligonucleótidos del extremo 5'

de *PvRACK1* en reverso. La primera reacción fue hecha con el oligonucleótido 5' CCGTAGGTCTTGTCCTCCTTGG 3' y el oligonucleótido del adaptador del banco. La segunda reacción se llevó a cabo con el oligonucleótido 5' CCACAGGATGATGGATTTGTCGC 3' y el oligonucleótido del adaptador del banco. Con las reacciones de PCR se amplificó un fragmento para cada digestión y se eligieron los dos fragmentos más grandes para ser secuenciados.

V.14 Análisis del Promotor

El formato FASTA de la secuencia genómica corriente arriba de la secuencia adyacente a la región codificante de *PvRACK11* fue usada en la base de datos de plantas de elementos regulatorios de DNA que actúan en *cis* (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/; Higo *et al.*, 1999), y en la base de datos de plantas de regiones promotoras de PolIII e inicio de la transcripción (<http://www.softberry.ru/berry.phtml>).

V.15 Procesamiento y Análisis de Nódulos por Microscopía Confocal y Electrónica

Microscopía Confocal.- Raíces y nódulos de 26 dpi, control sin vector y *PvRACK1*-silenciados inoculados con *R. tropici* CIAT 899-GFP fueron colectados, fijados, embebidos y polimerizados con metacrilato, seccionados, y rehidratados como reportó previamente Estrada-Navarrete *et al.* (2006). Después de la rehidratación, varias secciones de raíces y nódulos fueron montadas en un portaobjetos usando Citifluor (Ted Pella, Inc., Redding, CA, U.S.A.). Los cortes fueron observados con un dispositivo LSM-50 Meta Confocal unido a un microscopio Zeiss Axiovert 200 M. La excitación para GFP fue realizada a 488 nm, usando un laser Ar2 y un espejo de excitación dual dicróico HFT UV 488/543/633 nm con un filtro de emisión para detección LP 505. Finalmente, las imágenes fueron procesadas usando Adobe Photoshop 7.0 software (ADOBE SYSTEMS INC., Mountain View, CA, U.S.A.).

Microscopía Electrónica.- Nódulos de 26 dpi, control sin vector y *PvRACK1*-silenciados, inoculados con *R. tropici* CIAT 899-GFP fueron cortados en secciones de 1-2 mm, fijadas, deshidratadas (series de etanol 30-100%), y pre-embebidas en mezclas de resina óxido de propileno/epóxica (2:1, 1:1 y 1:2) (LONDON RESIN COMPANY LIMITED) por varias horas antes de ser embebidas en 100% de resina epóxica por 3 h. Piezas de nódulos en cápsulas de gelatina (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES, Washington, PA, U.S.A.) fueron embebidos en resina epoxica. Se hicieron cortes ultradelgados (70 nm) con un ultramicrotomo (LEICA, UCT-R), y fueron montados en rejillas de níquel. Los cortes en las rejillas fueron teñidos con 2% de acetato de uranilo acuoso, entonces fueron visualizados en un microscopio de transmisión electrónica Zeiss EM900 a 80 kV. Las micrografías se capturaron con una cámara digital CCD DualVision 300W (GATAN, INC.).

VI. RESULTADOS

VI.1 *PvRACK1* se Expresa Ubicuamente en Frijol

Con la finalidad de determinar los patrones de expresión de *PvRACK1* en otros tejidos además de los ejes embrionarios (en los cuales se identificó inicialmente; Islas-Flores *et al.*, 2009), se hicieron análisis por western blot y por qRT-PCR de nódulos, raíces, tallos y hojas de 15 dpi, y vainas en distintas etapas del desarrollo. Así, se determinó que *PvRACK1* tiene una expresión ubicua en los tejidos analizados (Fig. 3A y B); sin embargo, los patrones de acumulación varían a nivel de RNA mensajero y proteína. A nivel de RNA mensajero, *PvRACK1* se acumula mayoritariamente en vaina y tallo (Fig. 3B); mientras que a nivel de proteína, se observó que no hay variaciones significativas, aunque se observa mayor señal en el extracto de hoja (Fig. 3A). Por lo tanto, *PvRACK1* tiene una expresión ubicua, pero su expresión es diferente entre un tejido y otro (a nivel de RNA mensajero), lo que sugiere que puede estar regulada post-transcripcionalmente, y que esta regulación puede ser dependiente del tejido o la etapa del desarrollo.

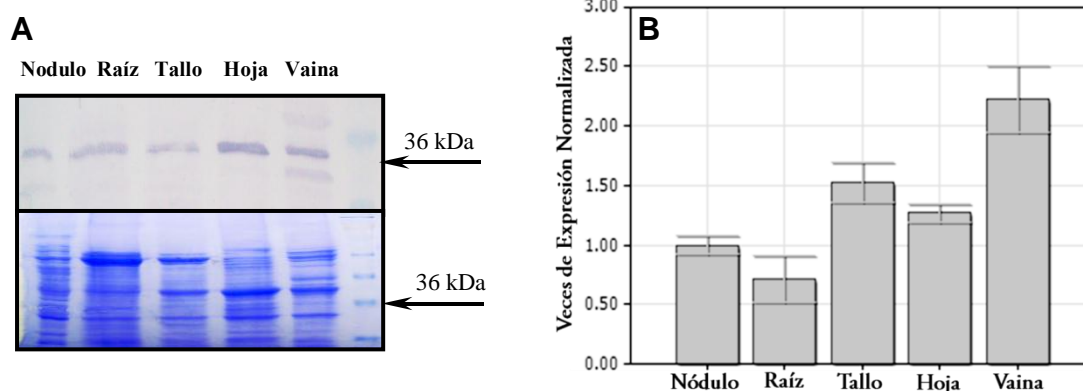


Fig. 3.- *PvRACK1* se expresa ubicuamente en frijol. Western blot, de extractos proteicos totales de nódulo, raíz, tallo, hoja y vaina (A) y RT-PCR en tiempo real de RNA total de nódulo, raíz, tallo, hoja y vaina (B). Los nódulos, raíces, tallos y hojas se colectaron de plantas de 15 d inoculadas con *R. tropici* CIAT899, y las vainas fueron colectadas en distintas etapas del desarrollo. En (A) la inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti-*PvRACK1*, a partir de un gel al 12% de poliacrilamida desnaturalizante. Las flechas de la derecha muestran la posición de migración del marcador de peso molecular de 36 kDa en el western blot (figura superior) y el gel correspondiente teñido con azul de Coomassie (figura inferior). En (B) las reacciones de amplificación para qRT-PCR se llevaron a cabo en triplicados y se normalizaron con el gen de referencia *PvEF1*. RNA total fue extraído de los tejidos de 5 plantas. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Las barras de error representan \pm SE.

VI.2 Soya y Chícharo Tienen una Proteína de 36 kDa Homóloga a PvRACK1

Para la caracterización bioquímica de PvRACK1, se diseñaron anticuerpos contra un decapeptido del amino terminal altamente conservado, por lo tanto se espera sean capaces de inmunodetectar a homólogos de RACK1 en otras plantas. La presencia de RACK1 en ejes embrionarios de frijol y soya, y en semilla de chícharo se analizó por western blot con anticuerpos anti-PvRACK1 (Fig. 4). El análisis reveló que los anticuerpos anti-PvRACK1, también reconocen a una proteína de 36 kDa en los extractos de soya y chícharo (Fig. 4), lo que indica que esas proteínas de 36 kDa pueden ser homólogas a PvRACK1 de frijol, y que los anticuerpos anti-PvRACK1 son útiles para inmunodetectar a sus contrapartes en soya y chícharo.

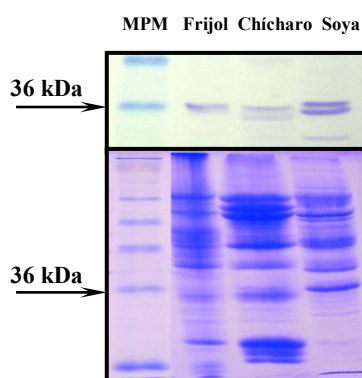


Fig. 4.- Los anticuerpos anti-PvRACK1 reconocen a una proteína de 36 kDa en semilla de chícharo y ejes embrionarios de soya. Western blot de extractos proteicos totales de ejes embrionarios de frijol, semilla de chícharo y ejes embrionarios de soya. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti-PvRACK1, a partir de un gel al 12% de poliacrilamida desnaturalizante. MPM, corresponde al marcador de peso molecular. Las flechas de la izquierda muestran la posición de migración del marcador de peso molecular de 36 kDa en el western blot (figura superior) y en el gel correspondiente teñido con azul de Coomassie (figura inferior). En el extracto de chícharo y soya se observa una banda debajo de la de 36 kDa que corresponde a degradación de la primera.

VI.3 PvRACK1 se Expresa Ubicualmente Durante la Nodulación

Como se observó anteriormente, PvRACK1 tiene una expresión ubicua, y su regulación varía en distintos tejidos; sin embargo, al parecer también puede tener una regulación diferente dependiendo de la etapa del desarrollo. Con la finalidad de analizar el patrón de expresión de PvRACK1 durante la nodulación, se llevó a cabo un análisis por qPCR de las etapas tempranas de la nodulación (las 3 h siguientes a la inoculación, Fig. 5C); y también se analizó por western blot (Fig. 5A) y qRT-PCR (Fig. 5B) de una cinética de nodulación de 21 días posteriores a la inoculación (dpi) con *R. tropici* CIAT899. Para el análisis de las etapas tempranas de la nodulación, se colectaron raíces de 3 d sin inocular, y de 30 min, 1 h, 2, h y 3 h después de la inoculación (hpi; Fig. 5C). En el caso de la nodulación, se colectaron raíces control no inoculadas de 3, 5 y 7 d, raíces inoculadas de 5 y 7 d, y nódulos de distintos tiempos de desarrollo (9, 12, 15, 18 y 21 dpi), y se llevó a cabo la extracción de proteínas y RNA de los tejidos colectados.

El resultado del análisis por western blot muestra que en la cinética de nodulación, la raíz de 5 y 7d inoculada y no inoculada, la expresión de *PvRACK1* disminuye respecto al nivel en raíz de 3 días no inoculada (Fig. 5A). Sin embargo, a los 9 dpi (Fig. 5A) se observa un aumento en la expresión de *PvRACK1* (Fig. 5A), y este nivel de expresión se mantiene constante hasta los 18 dpi (Fig. 5A), y decae de nuevo a los 21 dpi (Fig. 5A). Sin embargo, el análisis por qPCR a nivel de acumulación del RNA mensajero muestra poca variación durante la nodulación (Fig. 5B). Sin embargo, se observa que en los nódulos de 12 y 15d el nivel es mayor (Fig. 5B). En el caso de las primeras etapas de la nodulación, se observa que no hay cambios en el nivel de acumulación del mRNA de *PvRACK1* a los 30 min y 1 hpi, ya que no varían respecto a la raíz control de 3 días sin inocular; sin embargo, a las 2 y 3 hpi se observa que el nivel de mRNA incrementa significativamente (Fig. 5C). Estas observaciones son consistentes con variaciones en la expresión de *PvRACK1* de acuerdo al desarrollo del nódulo.

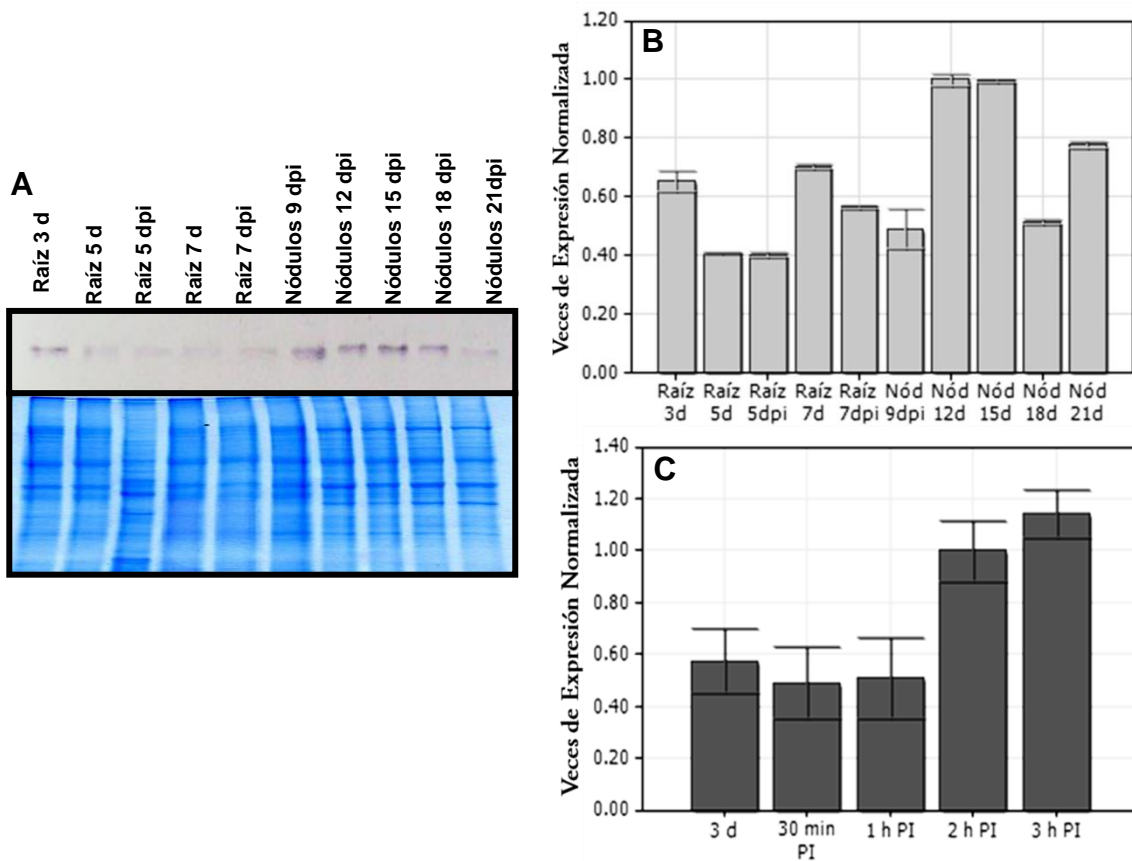


Fig. 5.- Análisis de expresión de *PvRACK1* en la nodulación de frijol. Western blot (A) y qRT-PCR en tiempo real (B-C) de extractos proteicos y de RNA total de raíz de 3d, raíz de 5 d, raíz de 5 dpi, raíz de 7 d, raíz de 7 dpi, y nódulos de 9, 12, 15, 18 y 21 dpi (B); y raíz de 3 d, de 30 min, 1 h, 2 h, y 3 hpi (C). Las raíces inoculadas y nódulos fueron inducidos con *R. tropici* CIAT899. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti-*PvRACK1*, a partir de un gel al 12% de poliacrilamida desnaturalizante. En (A), la figura inferior muestra el gel de poliacrimalida correspondiente, teñido con azul de Coomassie. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en triplicados y se normalizaron con el gen de referencia *PvEFI*. Se utilizaron las raíces de 2-3 plantas y los nódulos de 3-5 plantas. Se llevaron a cabo 2-3 repeticiones biológicas. Las barras de error representan \pm SE.

VI.4 Reguladores Hormonales de la Nodulación Inducen a *PvRACK1* en Raíz

Homólogos de RACK1 en plantas han mostrado estar involucrados en la respuesta hormonal (Ishida *et al.*, 1993; Iwasaki *et al.*, 1995; McKhann *et al.*, 1997; Kwak *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009). Previamente, se mostró que la expresión de *PvRACK1* no se veía severamente afectada por el tratamiento con IAA en etapas tempranas de la germinación (Islas-Flores *et al.*, 2009); sin embargo, no hay información respecto a si esta u otras hormonas influyen sobre la expresión de *PvRACK1* en otros tejidos o etapas del desarrollo. Con la finalidad de analizar el efecto de las hormonas en la expresión de *PvRACK1* en raíces de frijol, raíces de 7 días de *P. vulgaris*, fueron sometidas a tratamientos independientes con 10 μ M ABA (Fig. 6A), 25 μ M IAA (Fig. 6B), 25 μ M kinetina (Fig. 6C) y 10 μ M de GA₄ (Fig. 6D) durante 1, 3, 6 y 9 d. A los 3 y 6 d del tratamiento, se cambiaron las soluciones y se añadió la misma concentración de hormonas con la finalidad de mantener la concentración constante durante el tratamiento. Desde el primer día de tratamiento, se observó que todas estas hormonas inducen la expresión de *PvRACK1*, y que esta expresión disminuye conforme pasan los días (Fig. 6A, B, C y D). Este resultado indica que hormonas como las auxinas, ABA, citocininas y giberelinas regulan la expresión de *PvRACK1*, y que en consecuencia, *PvRACK1* podría estar regulando la respuesta a estas hormonas en raíces de *P. vulgaris*.

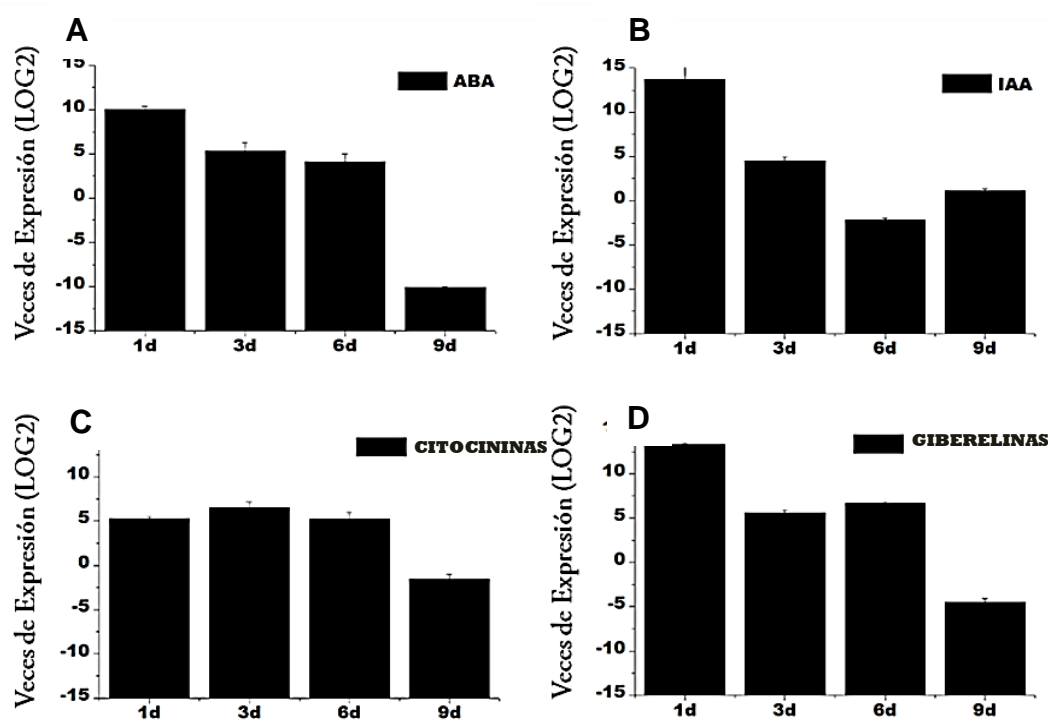


Fig. 6.- ABA, IAA, citocininas y giberelinas inducen la expresión de *PvRACK1* en raíces de frijol. PCR en tiempo real con RNA total de raíces de 1, 3, 6 y 9 d de tratamiento con 10 μ M ABA (A), 25 μ M IAA (B), 25 μ M kinetina (C) y 10 μ M GA₄ (D). Se germinaron semillas de frijol en servitoallas húmedas por 4 días, posteriormente las plántulas se transfirieron a medio B&D suplementado con nitrógeno por 3 días antes de añadir las hormonas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en triplicados y se normalizaron con el gen de referencia *PvEFI*. Se utilizó la raíz de 3-5 plantas en cada tratamiento y se llevaron a cabo 2 repeticiones biológicas. Las barras de error representan \pm SE.

VI.5 *PvRACK1* es Codificada por un Gen en *P. vulgaris*

Se sabía que *PvRACK1* pertenecía a una familia génica pequeña por un análisis de Southern blot que se llevó a cabo en un trabajo previo (Islas-Flores *et al.*, 2009); sin embargo, este análisis no es suficiente para concluir con precisión el número de genes que codifican una proteína, ni de conocer cuántos y en qué posición se encuentran los intrones en los genes. Para conocer estos datos, se llevó a cabo un análisis por PCR genómico. Para ello, se usaron oligonucleótidos que permiten amplificar el DNA desde el ATG de inicio, hasta el TAG de la terminación de la traducción. Este análisis mostró la amplificación de una sola población de fragmentos de DNA correspondiente a 975 pb (Fig. 7A, carril 2); que corresponde al tamaño del cDNA que codifica a *PvRACK1* (Fig. 7B, carril 2). Adicionalmente, se buscó la secuencia genómica de *PvRACK1* en un draft del genoma de *P. vulgaris*, y se encontró sólo un contig para *PvRACK1*. Esto apoya fuertemente los datos previos que sugieren que *PvRACK1* está representada por un solo gen en el genoma de *P. vulgaris*.

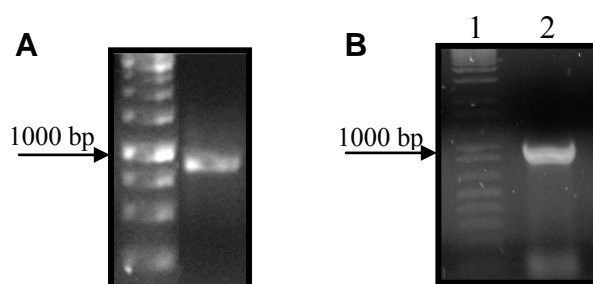


Fig. 7.- PCR genómico y RT-PCR DE *PvRACK1*. PCR genómico de *PvRACK1* con DNA total de *P. vulgaris* (A) y RT-PCR con RNA total de raíz (B) de *P. vulgaris*. Las reacciones se llevaron a cabo con oligonucleótidos que incluyen el ATG de inicio y el TAG de término de la traducción. Las reacciones de PCR y RT-PCR se repitieron 3 y 5 veces, respectivamente. Las flechas a la izquierda muestran los marcadores moleculares de 1000 pb's en el primer carril.

VI.6 Promotor de *PvRACK1*

Las secuencias promotoras de los genes son secuencias que contienen elementos de respuesta a factores metabólicos y que contienen la señal de inicio de la transcripción a RNA, regulando así el momento en que se transcribe el gen al que precede. Por lo tanto, el conocimiento de esta secuencia nos ayuda a comprender de qué forma se controla la expresión de los genes. Con la ayuda de un banco de DNA de promotores de frijol, se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos del extremo 5' de la secuencia de *PvRACK1* y oligonucleótidos de un adaptador que se añadió a las secuencias de promotores del banco. De esta manera se obtuvo la secuencia promotora de *PvRACK1* (Fig. 8).

```

1  AAATGAATCC TATTTGTGTA TATATATATG TGTAGGTATA CATAAATAAT
51  TGATTGGCCA ATATAAATTA AATATCTTAA TGTGCCATGT ATGAGAGGAG
101 ATTGAAAAGT CTAATTAATA TACTGAAACT TTGATTGGGC CTGAAAGAAG
    Element - 300 element
151 TTTGGGAATG TTGGGCCTAA AAGAAGTTGG GCGTATTGG GCCTGAAAGA
    SITEIIATCYTC element SITEIIATCYTC element
201 AGTTGGGAAT AGTGGGCCTG AAGTAAACTG AAACCGCAAC ACTTGAGGAA
    SITEIIATCYTC element
251 AAGAAAAAAA GGATCTGAAA ACCCTAATGA GGTGTGTGT ACCCGCTATA
    TATA box
301 TATTCTTTTCG CGAGAGGCAA AGCGTGGCTT AGAAACACAA AAGCCTCTCA
    +1
351 CAGAGTAAGG GAACTCGAAA ACCCTAGTAA TCTCTCATCT CTGTGTTCTT
401 TGTCTTCCTG TTAGAAGCAA AA

```

Fig. 8.- Secuencia del promotor de *PvRACK1*. La secuencia promotora de 422 pb's antes del ATG de inicio de la traducción se obtuvo secuenciando fragmentos de reacciones de PCR de un banco de promotores digeridos con las enzimas *EcoRV*, *PvuII*, *StuI* y *DraI*. La secuencia se analizó para buscar regiones regulatorias y se encontraron sitios potenciales de unión a elementos regulatorios de DNA que actúan en *cis* en plantas (se muestran subrayados). *TATA box*: La caja TATA dirige a la RNA polimerasa II al sitio de inicio de la transcripción; *ARRIAT element*: es un elemento de unión al regulador de respuesta a citocininas ARR1 (Hatorangan *et al.*, 2009); *-300 element*: secuencia reguladora -300; *telo box*: La caja telo en asociación con elementos que actúan en *cis*, participa la activación de la expresión de genes involucrados en la biogénesis de ribosomas (Gaspin *et al.*, 2010). *SITEIIATCYTC*: sitio de unión al dominio TCP de factores de transcripción, regula la expresión de proteínas con dominios de choque por frío (Nakaminami *et al.*, 2009). El extremo 5' de la secuencia del transcrito primario (sitio de inicio de la transcripción: +1) es mostrado. El análisis se llevó a cabo con (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/; Higo *et al.*, 1999, y <http://www.softberry.ru/berry.phtml>).

VI.7 Fenotipo del Silenciamiento de *PvRACK1*

El silenciamiento de la expresión de genes de interés permite llevar a cabo el análisis de cuáles son los procesos con los que se involucra, y por tanto, estos datos permiten proponer la función de las proteínas codificadas por estos genes.

RACK1 tiene la característica de ser una proteína de andamiaje, que de manera regulada participa en múltiples procesos de transducción de señales, incluyendo la señalización hormonal. Por lo tanto, para mantener el balance celular, la regulación de su expresión debe estar finamente controlada. Para analizar la función de *PvRACK1* en la nodulación, se amplificó por PCR un fragmento de 520 pb's del cDNA de *PvRACK1*, que fue clonado en el vector de entrada pENTR/D-TOPO. El vector pENTR/D-TOPO-520 pb's se recombinó con el vector destino pTDT-RNAi. Esta construcción se usó para transformar subsecuentemente la cepa de *A. rhizogenes* K599. Se inocularon plántulas de 3-7 días con la cepa *A. rhizogenes*-pTDT-RNAi-520 pb's. Se retiró la raíz primaria y se inocularon las raíces transgénicas con *R. tropici* CIAT899. Los nódulos y las raíces se cosecharon a los 26 dpi. El nivel de silenciamiento de *PvRACK1* se determinó por

RT-PCR en tiempo real (los niveles de silenciamiento fueron de aproximadamente 90%; Fig. 9D, derecha; P4RNAiR1, P6RNAiR1 y P6RNAiR2) en raíces (Fig. 9D, derecha; barras sólidas) y nódulos individuales (Fig. 9D, derecha; barras vacías). Los nódulos de las plantas compuestas transgénicas son escasos ($p < 0.001$), pequeños, blanquecinos y (Fig. 9C y D, izquierda; P4RNAiR1, P6RNAiR1 y P6RNAiR2) con respecto a las plantas control (Fig. 9A, B y D, izquierda; Empty vector y K599). El nivel de desarrollo de los nódulos silenciados indica un defecto en el crecimiento del nódulo, y es reminiscente de la etapa de desarrollo de un nódulo en la cual el crecimiento por expansión celular aún no ocurre. En esta etapa del desarrollo los niveles de acumulación del transcrito de *PvRACK1* en un nódulo normal corresponde al nivel observado de los 9-18 dpi (Fig. 5B). Estos resultados muestran claramente que el silenciamiento de *PvRACK1* afecta severamente el proceso de nodulación alterando su morfología y abundancia.

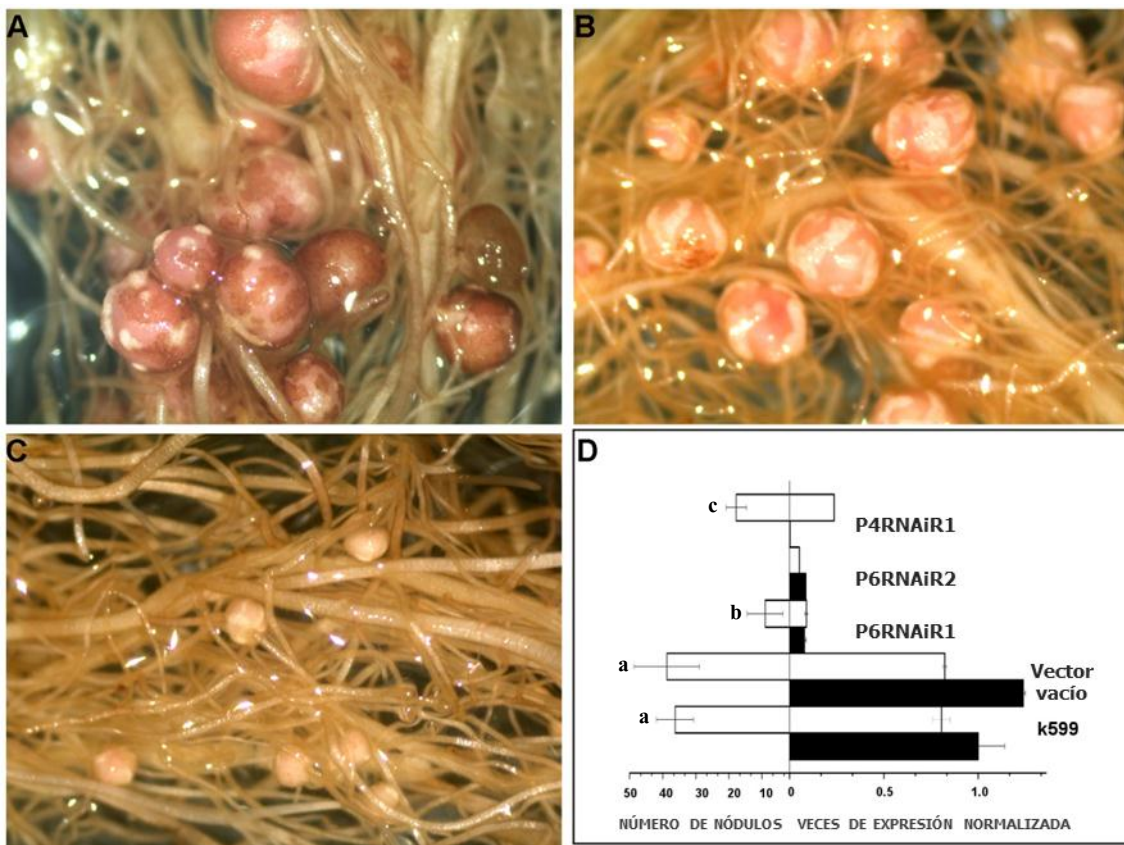


Fig. 9.- Fenotipo del silenciamiento de *PvRACK1*. Fenotipo de raíces y nódulos transgénicos de 26 dpi control (transformados con K599, A y transformados con K599-pTDT-RNAi-Empty, B), y silenciados (transformados con K599-pTDT-RNAi-*PvRACK1*, C). RT-PCR en tiempo real (D, derecha) con RNA total de raíces (barras sólidas) y nódulos (barras vacías) silenciados y control. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en triplicados y se normalizaron con el gen de referencia *PvEF1*. Se utilizó una raíz y los nódulos de esta por cada cepa. Las barras de error representan \pm SE. Número de nódulos en raíces control y silenciadas (D, izquierda), se contaron nódulos de 4 plantas por cada cepa. P4RNAiR1, P6RNAiR2 y P6RNAiR1, corresponden a raíces transformadas con distintas cepas de K599-pTDT-RNAi-*PvRACK1*. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas de acuerdo al test *t*, $p < 0.001$.

VI.8 La Reducción de la Expresión de *PvRACK1* Afecta el Desarrollo del Nódulo

El silenciamiento de *PvRACK1* afecta el tamaño de los nódulos (Fig. 9C), pero el fenotipo en términos de estructura celular puede proporcionarnos mayor información que permita suponer la función de *PvRACK1*. Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis microscópico de nódulos control y silenciados, y en ambos casos se observó que las células infectadas tienen la misma distribución en la zona central del nódulo (Fig. 10A-D, recuadro en A y C). Adicionalmente, se observó claramente que las células de la zona central del nódulo tienen un tamaño reducido, y el córtex se observó engrosado y muy desorganizado en los nódulos *PvRACK1*-silenciados (Fig. 10C-D, recuadro en C), comparado con los nódulos control (Fig. 10A-B, recuadro en A). Se midió el tamaño de las células de varias muestras y secciones, y se graficó para comparar la diferencia en dimensión de células infectadas (Fig. 11, barras vacías) y no infectadas (Fig. 11, barras sólidas) de nódulos control y *PvRACK1*-silenciados (Fig. 11, K599 y RNAi, respectivamente). Las diferencias más grandes se encontraron entre células infectadas de nódulos *PvRACK1*-silenciados (Fig. 11 RNAi, barra vacía) comparado con células infectadas de nódulos control (Fig. 11 K599, barra vacía). Las diferencias en tamaño fueron estadísticamente significativas tanto para células infectadas como para células no infectadas, lo que sugiere que la reducción en el tamaño celular se debe al silenciamiento de la expresión de *PvRACK1*.

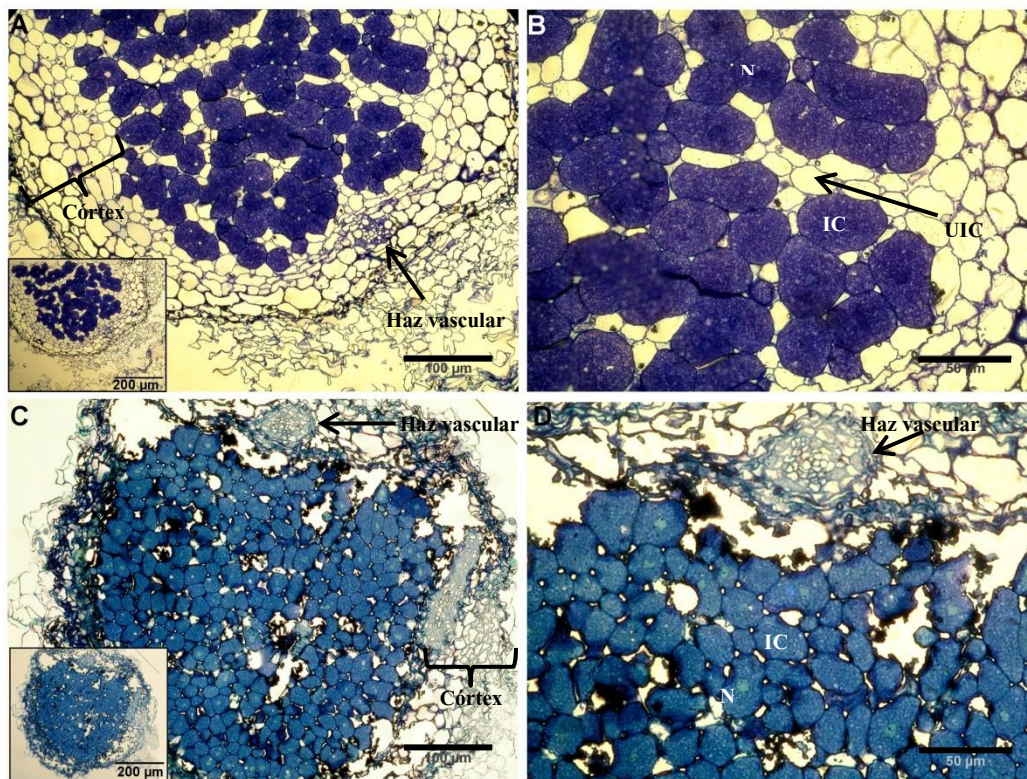


Fig. 10.- Anatomía de nódulos transgénicos de 26 dpi control y *PvRACK1*-silenciados. Las micrografías de luz fueron tomadas de cortes teñidos con azul de toluidina de nódulos *PvRACK1*-silenciados (C, recuadro, y D) y control (A, recuadro, y B) de 26 dpi. N=núcleo; UIC=célula no infectada; IC=célula infectada. Las barras en A y C corresponden a 100 μ m, en B y D corresponden a 50 μ m y en los recuadros en A y C corresponden a 200 μ m.

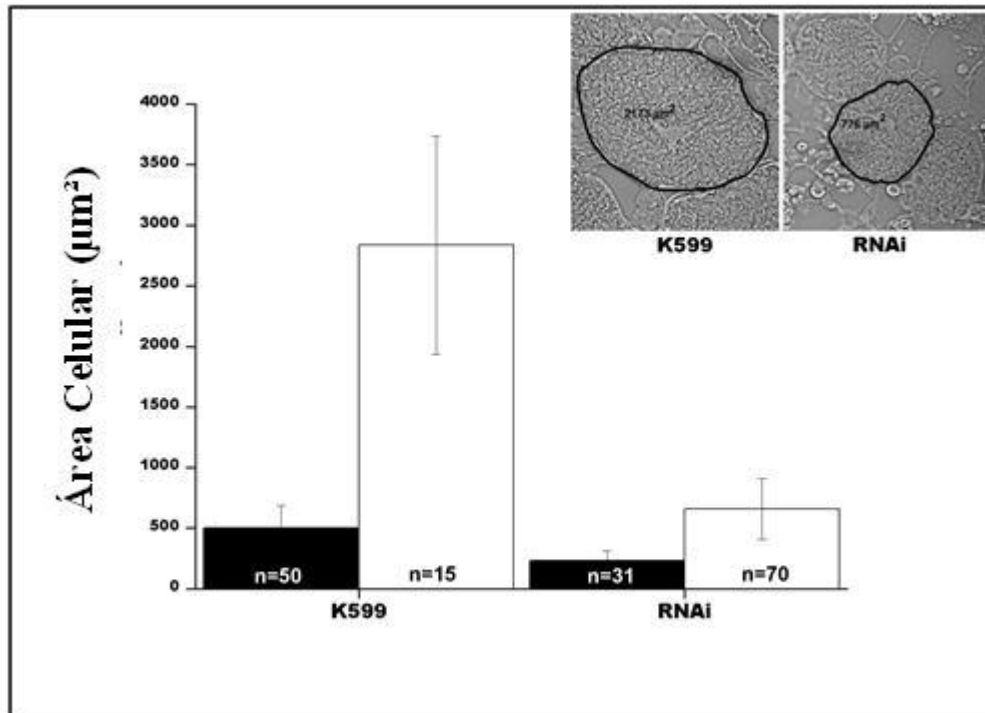


Fig. 11.- Tamaño de células infectadas y no infectadas de nódulos control y *PvRACK1*-silenciados. La gráfica muestra el área de las células infectadas (barras vacías), y no infectadas (barras sólidas). Los paneles en la parte superior derecha representan el área celular de una célula infectada de un nódulo control (K599) y de un nódulo *PvRACK1*-silenciado (RNAi). Las medidas de las áreas celulares se hicieron con micrografías de cortes semi-finos de 3 nódulos de cada cepa. Se contaron de 15-70 nódulos por cepa. $n=3$. El área se midió en μm^2 . n =número de células.

VI.9 Efecto del Silenciamiento de *PvRACK1* en la Ultraestructura de los Nódulos

Para obtener más información respecto al efecto del silenciamiento de la expresión de *PvRACK1*, se llevó a cabo un análisis a nivel sub-celular y ultra estructural de nódulos control y *PvRACK1*-silenciados de 26 dpi, por medio de microscopía electrónica. Las plantas compuestas se obtuvieron transformando plántulas de 2 d con *A. rhizogenes* K599 sola y llevando la construcción que expresa el RNAi de *PvRACK1* (pTDT-*PvRACK1*). Las plantas se incubaron en medio hidropónico a 22-25°C en un cuarto de crecimiento vegetal. Al tercer día se inocularon con *R. tropici* CIAT/899-DS-GFP y los nódulos fueron colectados a los 26 dpi. Las micrografías electrónicas, muestran características distintivas evidentes en las células infectadas de nódulos *PvRACK1*-silenciados (Fig. 12E-H). Las células infectadas y no infectadas de nódulos control fueron de tamaño y estructura regular (Fig. 12A-D), con bacteroides normales y abundantes (B en Fig. 12A, C y D) cubiertos por simbiosomas intactos (Fig. 12C y D), con una membrana peribacteroidal (PBM) completa, íntegra y bien delimitada (PBM en Fig. 12C). Sin embargo, la diferencia más evidente en las células infectadas de nódulos *PvRACK1*-silenciados (Fig. 12E-H) son los simbiosomas anormales con pocos bacteroides (Fig. 12G y H), y algunos bacteroides con superficie irregular (B en Fig. 12G y H). Además, la matriz citoplásmica y simbiosomal de células infectadas de nódulos control muestra un material electro denso que forma una red organizada (Fig. 12D). En contraste, las células infectadas de nódulos *PvRACK1*-silenciados son más densas y desorganizadas (Fig. 12F-H), y la matriz electro densa se observa severamente

desorganizada (Fig. 12H). Estos resultados indican que el silenciamiento de *PvRACK1* también tiene un efecto severamente negativo en la organización e integridad de los simbiosomas, de los bacteroides, así como de la matriz citoplásmica.

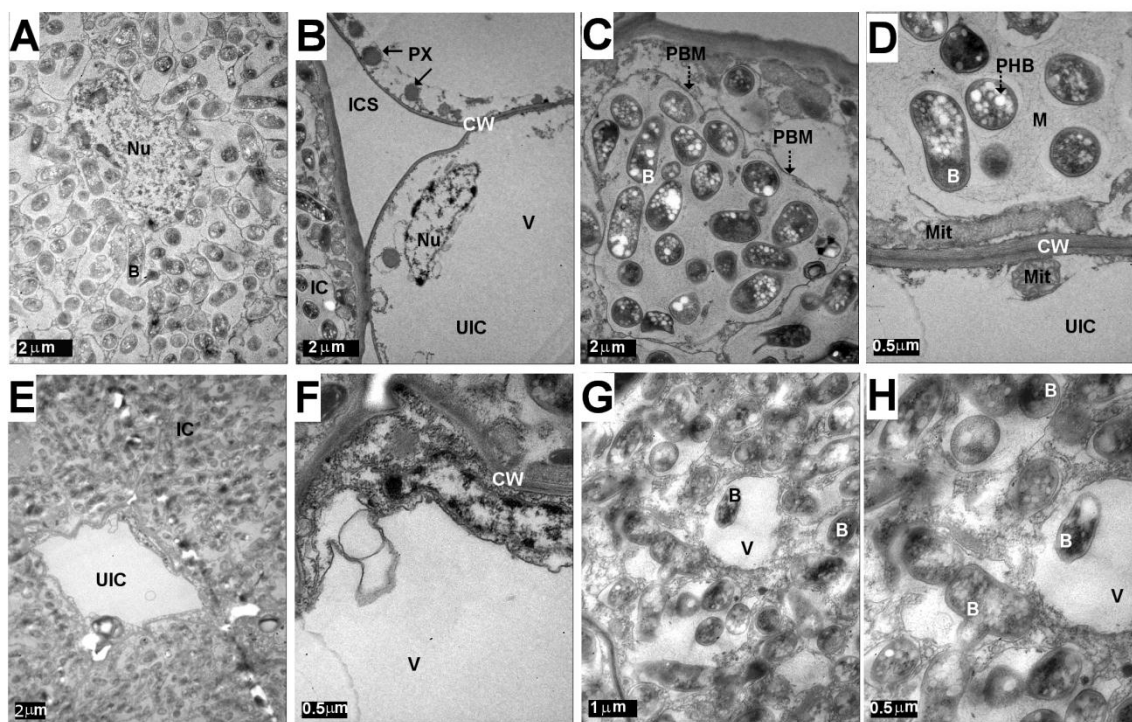


Fig. 12.- Ultraestructura de nódulos control y *PvRACK1*-silenciados. Micrografías de cortes ultra finos de nódulos control (A-D) y *PvRACK1*-silenciados (E-H) de raíces transgénicas de 26 dpi. ICS=espacio intracelular; IC=célula infectada; UIC=célula no infectada; Nu= núcleo; B=bacteroide; PX=peroxisoma; CW=pared celular; V=vacuola; PBM=membrana peribacteroidal; PHB=polihidroxibutirato; M=matriz, y Mit=mitochondria.

VI.10 El Exceso de *PvRACK1* Afecta Múltiples Procesos del Desarrollo

Las herramientas más importantes que se utilizan hoy en día para conocer la función de las proteínas es silenciar o aumentar su expresión. De esta forma, se puede observar el (los) fenotipo (s) resultantes de la falta o exceso de una proteína en particular y, por lo tanto, los procesos que se están afectando, lo que permite proponer la función que desempeña la proteína de interés. Para complementar el análisis del silenciamiento de *PvRACK1*, se clonó el cDNA que codifica a *PvRACK1* en el vector pENTR/D-TOPO y este se recombinó con el vector de expresión pH7FWG2. Esta construcción se transformó en *A. rhizogenes* K599, y sucesivamente se transformaron plántulas de frijol por el método utilizado por Estrada-Navarrete *et al.* (2007), y se dejaron en condiciones de invernadero (a temperatura ambiente) por 7 días. A este tiempo, las plantas transformadas con la construcción pH7FWG2-*PvRACK1* no habían formado el callo que precede a las raíces transgénicas (Fig. 13D) y se observó que toda la planta presentaba signos de necrosis (Fig. 13B y D), mientras que las plantas y raíces transgénicas control transformadas solo con K599 se desarrollaron normalmente (Fig. 13A y C). Este resultado indica que la sobre-expresión de *PvRACK1* produce un fenotipo letal en las condiciones en que se llevó a cabo este experimento. Con la finalidad de obtener muestras de nódulos que nos permitieran conocer qué eventos son

afectados por la sobre-expresión de *PvRACK1*, se repitió el procedimiento en 6 ocasiones, pero modificando el medio de crecimiento y la temperatura, y se observó que en condiciones controladas de menor temperatura (22-25 °C), la letalidad de las plantas disminuyó en un 10%; sin embargo, las plantas no formaron nódulos y las raíces se veían severamente afectadas (Fig. 13E). Entonces, se repitió el experimento, pero se modificó la transformación de las plantas (se inocularon plántulas de 2 días) y se transfirieron a medio hidropónico con solución B&D sin nitrógeno a 22-25°C, en un cuarto de crecimiento vegetal. A los 3 días, las raíces transgénicas fueron inoculadas con *R. tropici* CIAT899/DS-RED. Los nódulos y raíces fueron colectados a los 26 dpi. De esta forma se obtuvieron pocos nódulos (80% menos nódulos comparado con el control; $p < 0.001$), que presentan muchas vesículas y un córtex “esponjoso” (Fig. 14B, comparar con 14A). Los niveles de sobre-expresión de *PvRACK1* se cuantificaron por medio de qRT-PCR en raíces individuales (Fig. 13F), y fue notable que a mayor expresión, el fenotipo fue más severo. Este resultado indica que *PvRACK1* no sólo es indispensable para que se lleve a cabo la nodulación correctamente, ya que también es importante la regulación de su expresión en varios procesos del desarrollo de *P. vulgaris*.

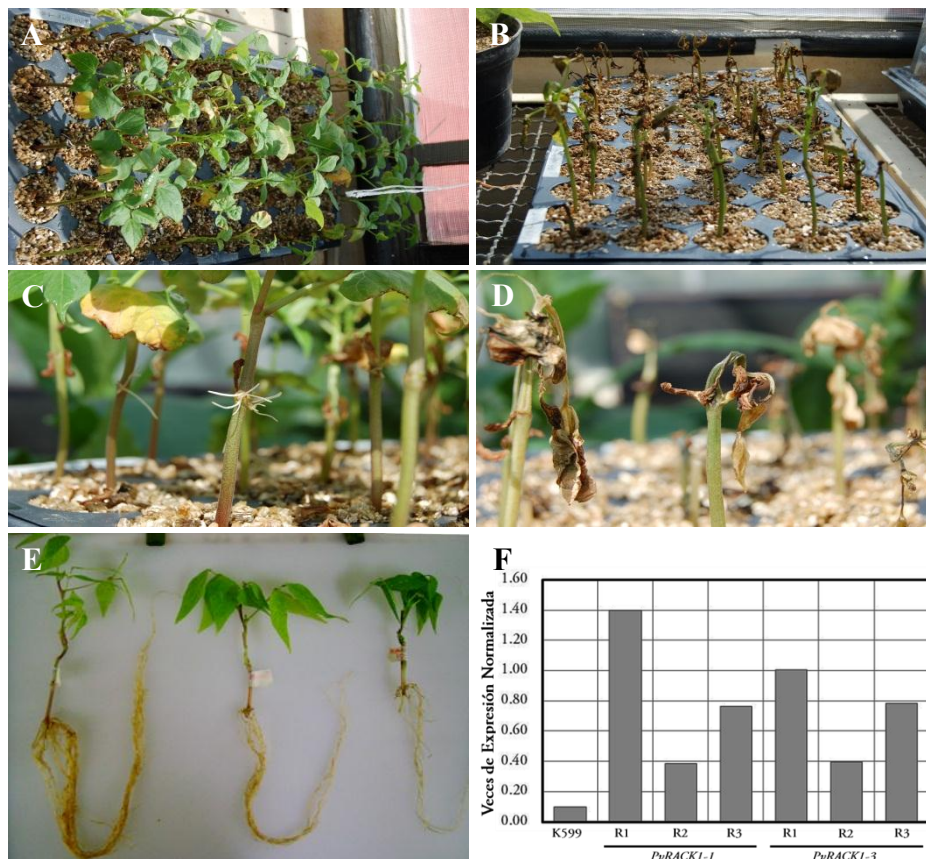


Fig. 13.- Fenotipo de la sobre-expresión de *PvRACK1*. Plantas compuestas control (A, C y E izquierda) y sobre-expresantes de *PvRACK1* (B, D y E centro y derecha). En A, B, C y D, se muestran plantas de 7 días de haber sido transformadas con *A. rhizogenes* K599 e incubadas en invernadero. En E se muestran plantas de 26 dpi con *R. tropici* CIAT899/DS-RED incubadas a 22-25°C en un cuarto de crecimiento. F, RT-PCR en tiempo real con RNA total de raíces transgénicas control (K599) y sobre-expresantes de *PvRACK1* (*PvRACK1-1* y *PvRACK1-3*). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en triplicados y se normalizaron con el gen de referencia *PvEF1*.

VI.11 La Sobre-expresión de *PvRACK1* Afecta la Integridad del Nódulo

El silenciamiento de *PvRACK1* mostró un fenotipo que resultó en defectos del desarrollo y en la integridad del nódulo; sin embargo, la sobre-expresión de *PvRACK1* muestra un fenotipo más severo respecto a la integridad de la planta, de la raíz y de los nódulos (Fig. 13B, D y E centro y derecha; Fig. 14C-D) comparado con el control (Fig. 13A, C y E izquierda; Fig. 14A-B). Micrografías de cortes semi-finos teñidos con azul de toluidina de nódulos control (Fig. 14A-B) y sobre-expresantes de *PvRACK1* (Fig. 14C-D) mostraron que la morfología del nódulo esta severamente afectada con la sobre-expresión de *PvRACK1*; las células infectadas no se distribuyen en la zona central del nódulo, y tienen núcleos más grandes (Fig. 14D) que las células infectadas del control (Fig. 14A-B). Otra diferencia evidente es que hay gran cantidad de vesículas en la zona central del nódulo de los nódulos sobre-expresantes de *PvRACK1* (Fig. 14C-D), y los haces vasculares son de mayor tamaño (Fig. 14C) comparado con el control (14A-B). Además, se observa que la capa correspondiente al córtex es más gruesa dando un aspecto esponjoso (Fig. 14C), mientras que en el control los haces vasculares son de tamaño y forma normal (Fig. 14A). Este fenotipo muestra que la sobre-expresión de *PvRACK1* afecta múltiples procesos del desarrollo del nódulo, alterando su morfología, y probablemente su función.

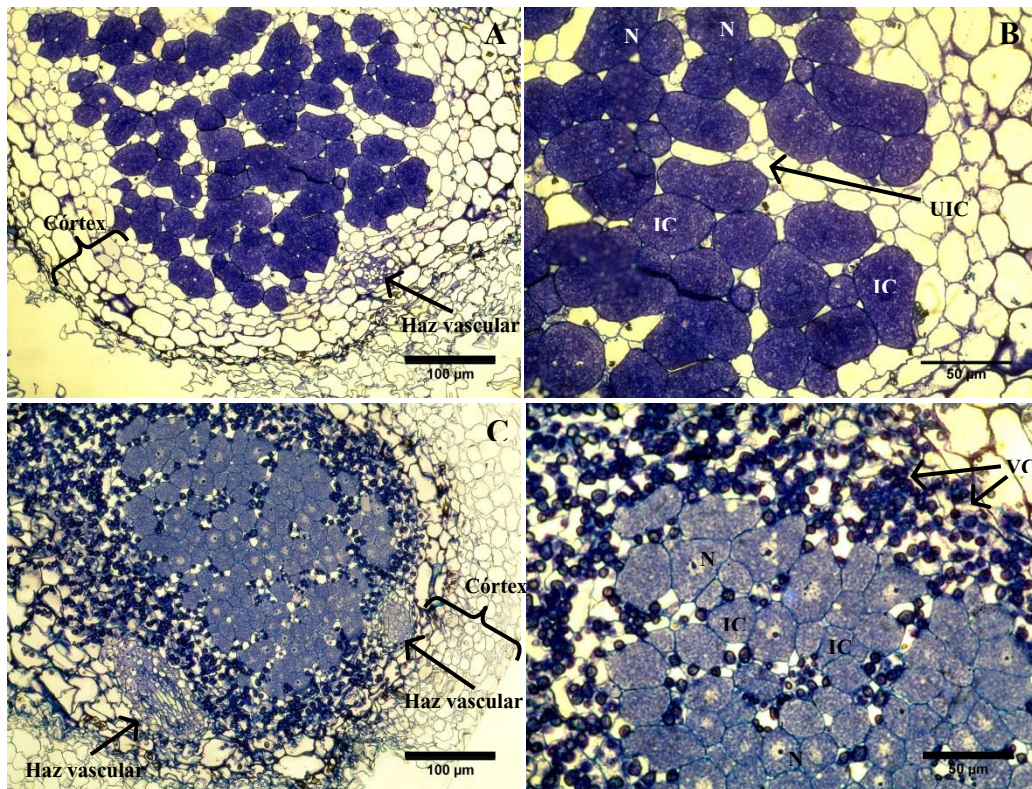


Fig. 14.- Anatomía de nódulos transgénicos de 26 dpi control y sobre-expresantes de *PvRACK1*. Las micrografías de luz fueron tomadas de cortes teñidos con azul de toluidina de nódulos sobre-expresantes de *PvRACK1* (C-D) y control (A-B) de 26 dpi. N=núcleo; UIC=célula no infectada; IC=célula infectada; VC=vesícula. Las barras en A y C corresponden a 100 µm, en B y D corresponden a 50 µm.

VI.12 Efecto de la Sobre-expresión de PvRACK1 en la Ultraestructura de los Nódulos

Se llevó a cabo el análisis de la estructura celular de nódulos de 26 dpi control y sobre-expresantes de PvRACK1. Se obtuvieron raíces transgénicas por medio de la inducción con *A. rhizogenes* K599 sola o llevando la construcción para la sobre-expresión de PvRACK1, y se inocularon con *R. tropici* CIAT/899-DS-RED. Los nódulos colectados a los 26 dpi fueron procesados como se menciona en materiales y métodos, y una característica de estos nódulos es que se observó durante el procesamiento que flotaban cuando se ponían en medio líquido, lo que coincide con el córtex de aspecto esponjoso que se observó en los cortes teñidos con azul de toluidina (Fig. 14C).

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica muestran que la sobre-expresión de PvRACK1 afecta el proceso de infección de los nódulos ya que se inhibe la nodulación, y las células infectadas, tienen escasos bacteroides comparado con las células infectadas de nódulos control (Fig. 15A-D, comparado con E-H). Los bacteroides de los nódulos que sobre-expresan PvRACK1, además de ser escasos, tienen un aspecto más denso que los bacteroides de los nódulos control (Fig. 15E y F, comparada con A y B respectivamente). También es evidente que los núcleos de las células infectadas de nódulos sobre-expresante son de mayor tamaño y tienen un material denso en la región de la envoltura nuclear, y el nucléolo es más evidente que en el control (Fig. 15F), mientras que el núcleo de las células infectadas del control tienen un aspecto normal (Fig. 15 B). Las células no infectadas contienen numerosas vesículas, la matriz muestra cúmulos de material denso, y las paredes celulares se encuentran plegadas y sin estructura definida (Fig. 15G, comparar con 15C), lo que hace que el nódulo se observe desorganizado. Otros defectos evidentes son que organelos como el retículo endoplásmico es muy grande comparado (RE en Fig. 15H) con los encontrados en las muestras control (RE en Fig. 15D). Este fenotipo muestra claramente que la sobre-expresión de PvRACK1 provoca defectos en varios procesos del desarrollo, como son la infección y la organización; y probablemente induce la senescencia temprana de los nódulos.

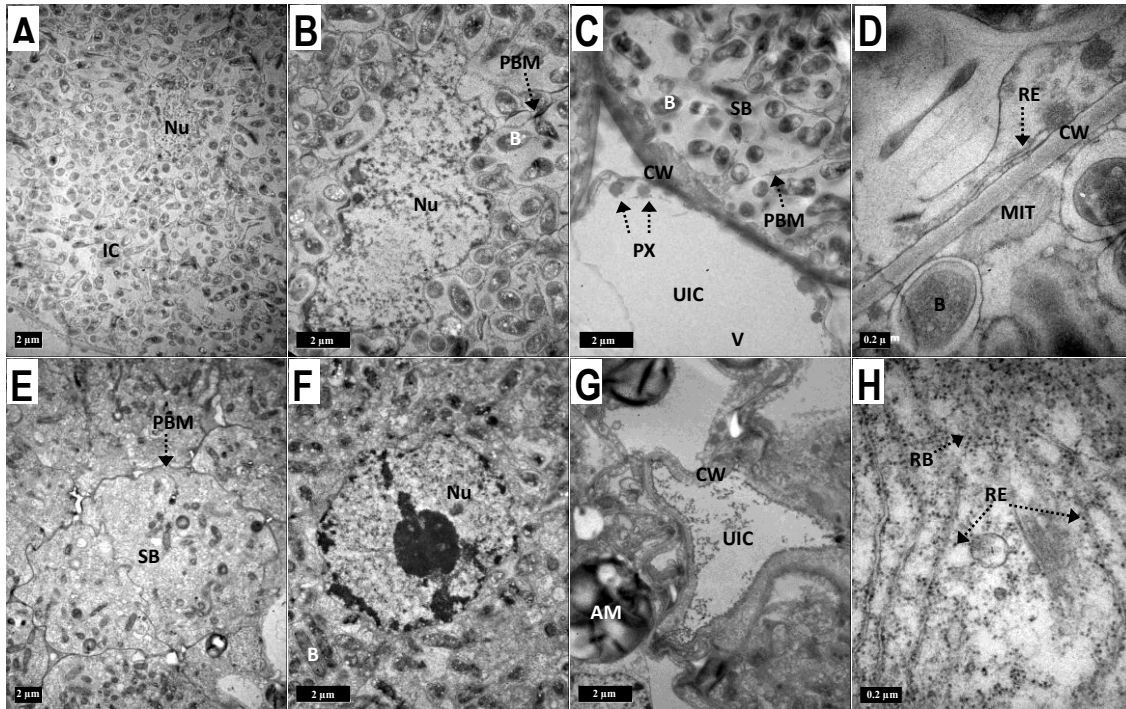


Fig. 15.- Ultraestructura de nódulos control y sobre-expresantes de *PvrACK1*. Microscopía electrónica de cortes ultra finos de nódulos control (A-D, K599) y *PvrACK1*-sobre-expresantes (E-H, 35S::*PvrACK1*-GFP) de raíces transgénicas de 26 dpi. IC=célula infectada; UIC=célula no infectada; Nu= núcleo; B=bacteroide; PX=peroxisoma; CW=pared celular; V=vacuola; PBM=membrana peribacteroidal; SB=simbiosoma; PHB=polihidroxitirato; M=matriz, y Mit=mitocondria, AM=amiloplasto; RE=retículo endoplásmico; CG=complejo de Golgi, y RB=ribosoma.

VII. DISCUSIÓN

RACK1 es una proteína altamente conservada en eucariotes, desde el género *Chlamydomonas* hasta plantas y humanos (Chen *et al.*, 2006). Se ha observado que en tejidos de mamíferos superiores y plantas, se encuentra expresada ubicuamente. Es una proteína versátil que puede formar complejos multiproteicos, y se le ha implicado en diversas vías de transducción de señales y en varios procesos celulares; tales como, neuropatología, estrés celular, traducción de proteínas y procesos del desarrollo. RACK1 se ha establecido como una proteína de andamio a través de la interacción física con una amplia gama de proteínas señalizadoras como proteínas cinasas, fosfatasas, canales iónicos, receptores de membrana, proteínas G, y con proteínas ribosomales (Ullah *et al.*, 2008). Su función en plantas no ha sido identificada, sin embargo, es de suponerse que estará implicada en diversas vías de señalización como se ha observado en animales.

El crecimiento de los nódulos y los tumores tienen similitudes en términos de angiogénesis (vascularización en plantas), y del requerimiento de proliferación celular activa. De hecho, RACK1 en mamíferos ha mostrado ser importante para el mantenimiento de la angiogénesis y el crecimiento de los tumores. RACK1 se sobre-expresa en tejidos angiogénicamente activos, *in vivo* e *in vitro*, es expresada en la angiogénesis de los tumores (Berns *et al.*, 2000), y es sobre-expresada en células de cáncer de colon (Saito *et al.*, 2002). RACK1 también promueve la proliferación del cáncer de mama y la invasión/metástasis *in vitro* e *in vivo*; mientras que el silenciamiento de RACK1 en cáncer de mama y en células LNCap inhibe la proliferación celular y por lo tanto el crecimiento del tumor (Cao *et al.*, 2009; Kraus *et al.*, 2006).

En plantas los homólogos de RACK1 parecen participar en varios procesos. El primer homólogo de RACK1 de plantas se identificó inicialmente como un gen de respuesta a auxinas en células BY2 de tabaco (Ishida *et al.*, 1993), y un gen relacionado se aisló subsecuentemente de alfalfa (McKhann *et al.*, 1997). Más recientemente RACK1 se identificó como componente de la subunidad 40S del ribosoma de plantas (Chang *et al.*, 2005; Giavalisco *et al.*, 2005), y como parte de un complejo inmune que media la respuesta innata en arroz (Nakashima *et al.*, 2008). La pérdida de función de RACK1A en *Arabidopsis* provoca respuestas alteradas a múltiples hormonas (Chen *et al.*, 2006). Recientemente, se encontró que los tres genes que codifican a RACK1 funcionan de manera redundante como reguladores negativos de las respuestas a ABA y median respuestas a estrés (Guo *et al.*, 2009). Adicionalmente, RACK1 es requerida para la producción normal de subunidades ribosomales (60S y 80S), y para la traducción de proteínas en *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2011).

Como en animales, en plantas los homólogos de RACK1 tienen una expresión ubicua, y *PvRACK1* no es la excepción ya que se expresa en todos los tejidos analizados de frijol (Raíz, Nódulos, Tallo, Hojas, Vainas; Fig. 3A-B, y Ejes embrionarios; Fig. 4, carril 2). El hecho de que RACK1 se exprese ubicuamente, indica que desempeña funciones celulares básicas, y el formar parte estructural del ribosoma apoya esta idea. Consistente con la hipótesis de que *PvRACK1* participa en procesos relacionados con la proliferación celular, encontramos que se expresa diferencialmente durante la nodulación (Fig. 5A-B y C), indicando que su patrón de expresión varía de acuerdo a la

etapa del desarrollo; sin embargo, se observó que la expresión de PvRACK1 se incrementa en las etapas tempranas de la nodulación (Fig. 5C), y en nódulos correspondientes a 9-18 dpi (Fig. 5A), etapas que corresponden a la inducción de la proliferación celular, y al crecimiento del nódulo por expansión celular (en nódulos determinados este proceso está sincronizado). Estas observaciones indican que PvRACK1 lleva a cabo funciones esenciales en la nodulación; sin embargo, para obtener más evidencias que apoyen este hecho, se llevó a cabo un análisis de la influencia del silenciamiento de PvRACK1 durante la nodulación.

El silenciamiento de PvRACK1 por RNAi en raíces transgénicas de plantas compuestas produce un fenotipo muy interesante en el cual disminuyó la nodulación en un 50-76% respecto al control (Fig. 9D izquierda), y el crecimiento también se vio disminuido (Fig. 9C comparado con 9A-B). Los nódulos silenciados presentan un desarrollo similar al de nódulos de 9 dpi, en donde apenas se establece el inicio del crecimiento del nódulo por expansión celular (Fernández-Luqueño *et al.*, 2008); y en donde la expresión de PvRACK1 incrementa (Fig. 5A), por lo cual es evidente la relación en el aumento de la expresión de PvRACK1, con las etapas de crecimiento del nódulo. Este fenotipo es consistente con el reportado para *Arabidopsis*, en el cual la pérdida de función de RACK1A mostró defectos en el desarrollo de plántulas y plantas maduras (hipocótilos más cortos y disminución de la producción de rosetas) (Chen *et al.*, 2006), aunque no se llevó a cabo un análisis microscópico para observar las estructuras celulares.

Durante la ontogenia del nódulo, las hormonas regulan su morfogénesis y desarrollo. Auxinas, citocininas, ABA y giberelinas pueden ser aisladas de los nódulos, donde se encuentran en concentraciones mayores que en raíces no infectadas (Hirsch and Fang, 1994), indicando que juegan un papel importante en la regulación de la morfogénesis y función del nódulo. Las auxinas, citocininas y giberelinas son reguladores positivos de la nodulación, mientras que ABA la regula negativamente. RACK1 ha mostrado jugar un papel importante en la señalización hormonal (Ishida *et al.*, 1993; Iwasaki *et al.*, 1995; Kwak *et al.*, 1997; McKhann *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009). En *Arabidopsis* la pérdida de función de RACK1A resultó en la alteración de la sensibilidad a estas hormonas. Se observó menor sensibilidad a giberelinas en la germinación y a auxinas en el desarrollo de la raíz; y más sensibilidad a ABA en la germinación y desarrollo temprano de la plántula (Chen *et al.*, 2006). En *M. sativa* el homólogo de RACK1, MsGB1 fue inducido cuando las raíces fueron tratadas con citocininas, y se detectó un alto nivel de acumulación en el meristemo del nódulo después de la inoculación con *S. meliloti* (McKhann *et al.*, 1997); lo que sugiere que MsGB1 desempeña un papel importante en la nodulación de esta planta. En este trabajo también encontramos que la expresión de PvRACK1 es modulada por la presencia de ABA, auxinas, citocininas y giberelinas durante el desarrollo de la raíz (Fig. 6A-D). Esto refleja los múltiples niveles de interacción hormonal con la regulación de la expresión de PvRACK1 durante la nodulación; lo que es consistente con el fenotipo del silenciamiento de PvRACK1 (Fig. 9C).

Los nódulos silenciados son más pequeños (Fig. 9C) que los nódulos control (Fig. 9A-B). Este fenotipo se debe a que las células no infectadas, y sobre todo las células infectadas son más pequeñas que las de nódulos control (Fig. 10C-D y RNAi en Fig. 11, comparado con Fig. 10A-B y K599 en Fig. 11), lo que resulta en nódulos de menor tamaño. En el caso de los nódulos determinados, el crecimiento se debe al proceso de expansión celular (cuando la actividad mitótica ha culminado). Esto indica que los

nódulos silenciados son más pequeños debido a un defecto en el proceso de expansión celular. *PvRACK1* podría estar involucrada en este proceso, ya que se observó que hay un incremento en su expresión en las etapas de crecimiento del nódulo (Fig. 5A, 9-18 dpi).

La expresión de *PvRACK1* es inducida por reguladores positivos de la nodulación, como las auxinas, citocininas y giberelinas; y por ABA y ROS, que son reguladores negativos de la nodulación (Ding and Oldroyd, 2009). A su vez ABA y ROS son regulados negativamente (ABA) y positivamente (ROS) por *RACK1* (Nakashima *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009). Entonces, es muy probable que con el silenciamiento de *PvRACK1* se esté afectando la señalización hormonal, provocando defectos en el desarrollo del nódulo, tales como la ausencia de expansión celular, y disminución de la nodulación (Fig. 9D izquierda). Por lo tanto se puede especular que la función de los homólogos de *RACK1* en la señalización hormonal de plantas, puede ser una de las claves del fenotipo del silenciamiento en la nodulación de *P. vulgaris*.

La disminución de la nodulación en el silenciamiento y sobre-expresión de *PvRACK1* (Fig. 9D izquierda y Fig. 13) también puede indicar que *PvRACK1* lleva a cabo una función importante en etapas tempranas de la nodulación, como lo es el proceso de infección. Esto es apoyado por el hecho de que se induce la acumulación del mRNA de *PvRACK1* en raíces inoculadas desde las 2-3 hpi (Fig. 5C). Además, *PvRACK1* media la respuesta hormonal de reguladores positivos y negativos de la nodulación, lo que permite concluir que la modificación en la expresión de *PvRACK1* (silenciandola o sobre-expresandola) es la causa de los fenotipos del silenciamiento y sobre-expresión de *PvRACK1* en la nodulación. Aunque no se puede concluir que el efecto del silenciamiento de *PvRACK1* es específico del nódulo, el hecho de que las raíces transgénicas silenciadas no se observan afectadas en las observaciones por microscopia confocal, sugiere que hay diferentes niveles de regulación de la morfogénesis y desarrollo de estos órganos.

Otras vías que se pueden estar afectando por el silenciamiento de *PvRACK1* es la de síntesis, tráfico y reciclaje de membrana; las cuales son indispensables para que se lleve a cabo la expansión celular. En un reporte reciente, el silenciamiento de *srab1* y *vrab7* en soya, resultó en nódulos de tamaño reducido, mientras que el simple silenciamiento de *srab1* causó que se inhibiera la nodulación y se formaran pocos nódulos (Cheon *et al.*, 1993). Rab1p y Rab17 son pequeñas proteínas de unión a GTP, que están involucradas en la biogénesis de la MPB (Cheon *et al.*, 1993); así que un defecto en estas proteínas podría afectar severamente la dinámica de la membrana y por lo tanto la morfología del nódulo. Estos datos son consistentes con el fenotipo causado por la modificación de la expresión de *PvRACK1*, ya que con el silenciamiento se afecta la expansión celular y la integridad de la MPB (Fig. 10C-D, Fig. 11 y Fig. 12 G-H). Así es que es posible que *PvRACK1* también sea importante para la dinámica de la membrana, y su silenciamiento puede resultar en un efecto aditivo de la interferencia en el tráfico de membranas, y en la señalización hormonal durante el desarrollo e integridad del nódulo.

El tráfico vesicular es necesario durante la síntesis de membrana y para la expansión celular. Por lo tanto, la pérdida de la regulación de este proceso podría afectar la síntesis de membrana en sitios clave para la expansión celular; lo que resultaría en células y PBM de tamaños y/o formas anormales (como las observadas en el silenciamiento (Fig.

10D, RNAi en Fig. 11 y Fig. 12 G-H), y en la sobre-expresión (Fig. 14D y 15F y D)). RACK1 en mamíferos se une a PI3K para participar en los procesos de tráfico vesicular y reciclaje de endosomas. Además, se ha reportado que PI3K desempeña un papel fundamental en la localización de Rab11 durante la mitosis en *C. elegans* (Chen *et al.*, 2008; McCahill *et al.*, 2002; Ai *et al.*, 2009).

Regularmente, el silenciamiento de la expresión de una proteína proporciona información que permite suponer la función de esta; sin embargo, el hecho de que la función no se elimine por completo, puede resultar en alteraciones fenotípicas leves que lleven a excluir funciones importantes. Por esta razón, es muy importante llevar a cabo el análisis de la sobre-expresión de la proteína, para complementar la información que se obtiene de su silenciamiento, y proponer con mayor sustento su posible función.

La sobre-expresión de *PvRACK1* causó severos daños en las plantas (Fig. 13B, D, E; centro y derecha) al ser transformadas e incubadas en condiciones de invernadero (en donde la temperatura era variable), e incluso no permitió que se formaran las raíces transgénicas, por lo que es de suponer que el exceso en su expresión afecta procesos celulares vitales para las plantas. Sin embargo, el hecho de que en medio hidropónico con temperatura constante de 22-25°C se obtuvieron nódulos (80% menos que en el control), indica que la sobre-expresión de *PvRACK1* podría estar afectando las respuestas al estrés. Recientemente, se encontró que RACK1A, B y C de *Arabidopsis* tienen una función redundante como reguladores negativos de las respuestas a ABA y también modulan las respuestas al estrés (Guo *et al.*, 2009). En arroz *OsRACK1* es inducida por el estrés biótico, y su sobre-expresión promueve la producción de ROS (Nakashima *et al.*, 2008). Estos datos permiten proponer que la sobre-expresión de *PvRACK1*, a su vez podría inducir la sobre-producción de ROS. El exceso de ROS causa estrés oxidativo, dañando los tejidos; esto se hace evidente en toda la planta. Otros aspectos que fueron evidentes a nivel ultra estructural en la sobre-expresión, es que los núcleos, y el retículo endoplásmico en las células infectadas son de mayor tamaño que en el control (Fig. 15 F, H y B, D; respectivamente). Con diversos estudios, se comprobó que RACK1 es parte estructural del ribosoma en *Arabidopsis*, y que participa en la regulación de la traducción de proteínas (Guo *et al.*, 2011), por lo cual su sobre-expresión puede afectar la cantidad de ribosomas, como se puede ver en la Fig. 15H. Además, en el ribosoma interactúa con factores traduccionales, a los que puede activar y/o inhibir de forma descontrolada y por lo tanto provocar el fenotipo que se observa en los nódulos sobre-expresantes. Alternativamente, en base a la apariencia deteriorada de los nódulos sobre-expresantes de *PvRACK1*, se debe tener en cuenta que se podría estar induciendo una senescencia temprana. Algunos signos de senescencia son el retículo endoplásmico prominente (Fig. 15H), complejo de Golgi y mitocondrias abundantes, y numerosas vesículas (Fig. 14C-D) (Guerra *et al.*, 2010).

La prueba que nos permitiría aclarar los niveles en los que participa RACK1 en la nodulación, sería el análisis de sus ligandos en plantas. A la fecha se conocen pocos de sus ligandos en plantas (en arroz interactúa con Rac1, con la NADPH oxidasa Rboh, con RAR1 (*por sus siglas en inglés: Required for Mla12 Resistance*), y SGT1 (*por sus siglas en inglés: Suppressor of the G2 allele of skp1*)) (Nakashima *et al.*, 2008). Los datos obtenidos en este trabajo indican que *PvRACK1* desempeña un papel importante en el crecimiento y mantenimiento del nódulo, ya que las células infectadas y los bacteroides se observan deteriorados, lo que es un indicativo de que la función del nódulo está afectada.

Se conoce que RACK1 es una proteína versátil que tiene muchos ligandos, lo cual le confiere la capacidad de participar en diversas funciones biológicas. Esto hecho nos permite suponer que su regulación está finamente controlada, y que es muy difícil asignarle una sola función. Por esta razón, varias funciones celulares son probablemente afectadas al alterar su expresión. Independientemente de las funciones específicas de *PvRACK1* que conducen al desarrollo normal de los nódulos en frijol, aquí se demuestra claramente que el control de la expresión de *PvRACK1* es indispensable para la integridad del simbiosoma, el desarrollo del bacteroide y la expansión celular en los nódulos de frijol.

VII.1 Perspectivas

La habilidad de RACK1 de interactuar con una amplia gama de proteínas señalizadoras se refleja en las múltiples funciones celulares vitales en las que se le ha implicado. Sin embargo, no se conoce cómo se controla la unión de RACK1 a distintas combinaciones específicas de proteínas que controlan funciones celulares individuales. Esto sugiere que debe haber competencia entre las proteínas que se unen a RACK1; lo que implica que RACK1 contribuye con la regulación del equilibrio entre la activación de vías de señalización agonistas y antagonistas. Por otra parte, proteínas individuales se pueden unir a RACK1 en sitios intracelulares discretos, compitiendo por unirse a RACK1 con un grupo diferente de proteínas dependiendo del sitio intracelular en el que se encuentren. Para concluir el análisis funcional de RACK1 en plantas, con la información que se tiene actualmente, no se puede descartar ninguna posibilidad. Los análisis futuros en frijol deben enfocarse en la identificación de los ligandos de *PvRACK1* en distintos procesos celulares. Esto permitirá conocer los procesos celulares en los que esta involucrada, y determinar en que parte de la o las vías de señalización se encuentra ubicada. De esta forma, se podrá concluir la importancia de RACK1 en los procesos del desarrollo de plantas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. **Ai E, Poole DS, Skop AR** (2009). RACK-1 directs dynactin-dependent RAB-11 endosomal recycling during mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **20**:1629-1638
2. **Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GE, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Denarié J, 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 J* **34**:495-506
3. **Andreev I, Krylova V, Dubrovo P, Izmailov S** (2005). Passive potassium transport by symbiosomes from broad bean root nodules. *Plant Sci* **168**:1005-1010
4. **Ané JM, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GE, Ajax C, Lévy J, Debelle F, Baek JM, Kalo P, Rosenberg C, Roe BA, Long SR, Dénarié J, Cook DR** (2004). *Medicago truncatula* DM11 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**:1364-1367
5. **Arshad M, Frankenberger WT** (2002). Ethylene: agricultural sources and applications. *Ann Bot* **90**:424
6. **Bauer P, Ratet P, Crespi M, Schultze M, Kondorosi A** (1996). Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and Msenod12A expression patterns in alfalfa roots. *Plant J* **10**:91-105
7. **Beijerinck MW** (1888). The root-nodule bacteria. *Gen Microbiol* **46**:725-804
8. **Berns H, Humar R, Hengerer B, Kiefer F, Battegay E** (2000). RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas. *FASEB J* **14**:2549-2558
9. **Cao XX, Xu JD, Xu JW, Liu XL, Cheng YY, Li QQ, Xu ZD, Liu XP** (2009). RACK1 promotes breast carcinoma proliferation and invasion/metastasis *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res Tr* **123**:375-386
10. **Cárdenas L, Domínguez J, Quinto C, López-Lara IM, Lugtenberg BJ, Spaink HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE** (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol* **29**:453-464
11. **Cárdenas L, Holdaway-Clarke TL, Sánchez F, Quinto C, Feijó JA, Kunkel JG, Hepler PK** (2000). Ion changes in legume root hairs responding to nod factors. *Plant Physiol* **123**:443-451
12. **Cárdenas L, Vidali L, Domínguez J, Pérez H, Sánchez F, Hepler PK, Quinto C** (1998). Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Plant Physiol* **116**: 871-877
13. **Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Denarié J** (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**:1647-1666
14. **Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhauser N, Marchisio PC, Biffo S** (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* **426**:579-584
15. **Chang I-F, Szick-Miranda K, Pan S, Bailey-Serres J** (2005). Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of Arabidopsis cytosolic ribosomes. *Plant Physiol* **137**:848-862

16. **Chen JG, Ullah H, Temple B, Liang J, Guo J, Alonso J, Ecker J, Jones A** (2006). RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **57**:2697-2708
17. **Chen S, Lin F, Shin ME, Wang F, Shen L, Hamm HE** (2008). RACK1 regulates directional cell migration by acting on G $\beta\gamma$ at the interface with its effectors PLC β and PI3K γ . *Mol Biol Cell* **19**:3909-3922
18. **Chen WM, Laevens S, Lee TM Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P** (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Micr* **51**:1729-1735
19. **Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson C** (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* **185**:7266-7272
20. **Cheon CL, Lee NG, Siddique AB, Bal AK, Verma DP** (1993). Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed *de novo* during root nodule symbiosis. *EMBO J* **12**:4125-4135
21. **Chomczynski P, Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159
22. **Colebatch G, Kloska S, Trevaskis B, Freund S, Altmann T, Udvardi M** (2002). Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *Mol Plant Microbe In* **15**:411-420
23. **Compaan B, Yang WC, Bisseling T, Franssen H** (2001). ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*-legume interaction and the highly conserved internal region of the gene does not encode a peptide. *Plant Soil* **230**:1-8
24. **Cooper JB, Long S** (1994). Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by trans-zeatin secretion. *Plant Cell* **6**:215-225
25. **Coronado C, Silveira JA, Sallaud C, Quirion JC, Esnault R, Husson HP, Kondorosi A, Ratet P** (1995). Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiol* **108**:533-542
26. **D'Haese W, Holsters M** (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**:79R-105R
27. **Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L** (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci* **58**:61-67
28. **Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénarié J, Boivin C** (2001). nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochim Pol* **48**:359-365
29. **Dénarié J, Debellé F, Truchet G, Promé JC** (1993). *Rhizobium* and legume nodulation: a molecular dialogue. *New Horizons in Nitrogen Fixation* ed. Palacios R, Mora J, Newton WE. Dordrecht: Kluwer 19-30
30. **Ding Y, Kalo P, Yendrek C, Sun J, Liang Y, Marsh JF, Harris JM, Oldroyd GED** (2008). Abscisic acid coordinates Nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**:2681-2695
31. **Ding YL, Oldroyd GED** (2009). Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signal Behav* **4**:89-93.

32. **Dudley ME, Jacobs TW, Long SR** (1987). Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* **171**:289-301
33. **Ehrhardt DW, Wais R, Long SR** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**:673-681
34. **Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Milhacea S, Kalo P, Kiss G** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**:962-966
35. **Esseling JJ, Lhuissier FGP, Emons AMC** (2003). Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol* **132**:1982-1988
36. **Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sánchez F** (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* **2**:1819-1824
37. **Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Diaz-Camino C, Santana O, Murillo E, Guillen G, Sanchez-Guevara N, Acosta J, Quinto C, Li DX, Gresshoff PM, Sanchez F** (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: A tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe In* **19**:1385-1393
38. **Etesami H, Alikhani HA, Akbari AA** (2009). Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by iranian soils Rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. *World Appl Sci J* **6**:1576-1589
39. **Fahraeus A** (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microb* **16**:374-381
40. **Fang Y, Hirsch AM** (1998). Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol* **116**:53-68
41. **Felle HH, Kondorosi É, Kondorosi A, Schultze M** (1998). The role of ion fluxes in Nod factor signaling in *Medicago sativa*. *Plant J* **13**:455-463
42. **Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff M** (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* **52**:61-67
43. **Fernández-Luqueño F, Dendooven L, Munive A, Corlay-Chee L, Serrano-Covarrubias LM, Espinosa-Victoria D** (2008). Micro-morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules undergoing senescence. *Acta Physiol Plantarum* **30**:545-552
44. **Fomenkov A, Zangen R, Huang YP, Osada M, Guo Z, Fomenkov T, Trink B, Sidransky D, Ratovitski EA** (2004). RACK1 and Stratifin target Δ Np36 α for a proteasome degradation in head and neck squamous cell carcinoma cells upon DNA damage. *Cell Cycle* **3**:1285-1295
45. **Fulop V, Jones DT** (1999). Beta propellers: structural rigidity and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* **9**:715-721
46. **Gage DJ** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microb Mol Biol Rev* **68**:280-300
47. **Gaspin C, Rami JF, Lescure B** (2010). Distribution of short interstitial telomere motifs in two plant genomes: putative origin and function. *BMC Plant Biol* **10**:283
48. **Geurts R, Bisseling T** (2002). *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *Plant Cell Supp*:S239-S249

49. **Geurts R, Fedorova E, Bisseling T** (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol* **8**:346-352
50. **Geurts R, Franssen H** (1996). Signal transduction in *Rhizobium*-induced nodule formation. *Plant Physiol* **112**:447-453
51. **Giavalisco P, Wilson D, Kreitler T, Lehrach H, Klose J, Gobom J, Fucini P** (2005). High heterogeneity within the ribosomal proteins of the *Arabidopsis thaliana* 80S ribosome. *Plant Mol Biol* **57**:577-591
52. **Gollop R, Santhaguru K, Avissar YJ** (1984). Control of the initial steps in heme biosynthesis in free-living *Rhizobium* sp. by culture conditions. *Curr Microb* **11**:101-106
53. **Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F** (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **18**:2680–2693
54. **Graham PH, Parker KA, Oakley AE, Lange RT, Sanderson JV** (1963). Spore formation and heat resistance in *Rhizobium*. *J bacteriol* **86**:1353-1354
55. **Gresshoff PM** (1993). Molecular genetic analysis of nodulation genes in soybean. *Plant Breeding Rev* **11**:275-318
56. **Gresshoff PM, Delves AC** (1986). Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: Blonstein AD, King PJ. *Plant Gene Research III. A Genetical Approach to Plant Biochemistry*. Springer Verlag, Wien. 159-206
57. **Gresshoff PM** (2003). Post-genomic insights into plant nodulation symbioses. *Genome Biol* **4**:201
58. **Guerra JC, Coussens G, De Keyser A, De Rycke R, De Bodt S, De Velde WV, Goormachtig S, Holster M** (2010). Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **152**:1574-1584
59. **Guo J, Wang J, Xi L, Huang WD, Liang J, Chen JG** (2009). RACK1 is a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **60**:3819-3833
60. **Guo J, Wang S, Valerius O, Hall H, Zeng Q, Li J-F, Weston DJ, Ellis BE, Chen JG** (2011). Involvement of *Arabidopsis* RACK1 protein translation and its regulation by abscisic acid. *Plant Physiol* **155**:370-383
61. **Halbleib CM, Ludden PW** (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr* **130**:1081-1084
62. **Harris JM, Wais R, Long SR** (2003). *Rhizobium*-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe In* **16**:335–341
63. **Hatorangan MR, Sentausa E, Wijaya GY** (2009). *In silico* identification of cis-regulatory elements of phosphate transporter genes in rice (*Oryza sativa* L.). *J Crop Sci Biotech* **12**:25-30
64. **Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM, Wallace JC** (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:6602-6606
65. **Herder J, Vanhee C, De Rycke R, Corich V, Holsters M, Goormachtig S** (2007). Nod factor perception during infection thread growth fine-tunes nodulation. *Mol Plant Microbe In* **20**:129–137
66. **Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucl Acids Res* **27**:297-300
67. **Hirsch AM** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* **122**: 211–237

68. **Hirsch AM, Fang Y** (1994). Plant hormones and nodulation: What's the connection? *Plant Mol Biol* **26**:5-9
69. **Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Kawaguchi M, Parniske M, Hayashi M, Kawasaki S** (2005). Host genes involved in activation and perception of calcium spiking. *Plant Cell Physiol* **46**:S5-S5
70. **Ishida S, Takahashi Y, Nagata T** (1993). Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein β subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:11152-11156
71. **Islas-Flores T, Guillén G, Islas-Flores I, San Román-Roque C, Sánchez, Loza-Tavera H, Bearer E, Villanueva MA** (2009). Germination behavior, biochemical features and sequence analysis of the RACK1/arcA homolog from *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* **137**:264-280
72. **Iwasaki Y, Komano M, Ishikawa A, Sasaki T, Asahi T** (1995). Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty-amino-acid repeat (WD-40 repeat). *Plant Cell Physiol* **3**:505-51
73. **Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EM, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, Jensen TH, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca^{2+} spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:359-364
74. **Kiyosue T, Ryan C** (1999). The electronic plant gene register. *Plant Physiol* **119**:1567-1568
75. **Kraus S, Gioeli D, Vomastek T, Gordon V, Weber MJ** (2006). Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) and Src regulate the tyrosine phosphorylation and function of the androgen receptor. *Cancer Res* **66**:11047-11054
76. **Krusell L, Madsen L, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, Bruijn F, Pajuelo E, Sandal N, Stougaard J** (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* **420**:422-426
77. **Kwak J, Kim S, Lee S, Oh S-A, Byoun C-H, Han J-K, Nam H** (1997). cDNA clone with high similarity to a mammalian receptor for activated protein kinase C. *Planta* **201**:245-251
78. **Laemmli U** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
79. **Laeremans T, Vanderleyden J** (1998). Review: Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World J Microbiol Biotechnol* **14**:787-808
80. **Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C, Debelle F** (2004). A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**:1361-1364
81. **Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R** (2003). LysM domain receptor kinases regulating *Rhizobium* Nod factor-induced infection. *Science* **302**:630-633
82. **Lin YH, Ferguson BJ, Kereszt A, Gresshoff PM** (2009). Suppression of hyper-nodulation in soybean by a leaf-extracted, NARK and Nod factor-dependent low molecular mass fraction. *New Phytol* **185**:1074-1086

83. **Lorteau MA, Ferguson BJ, Guinel FC** (2001). Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle. *Physiol Plant* **112**:421-428
84. **Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637-640
85. **Malik NSA, Pence MK, Calvert HE, Bauer WD** (1984). *Rhizobium* infection and nodule development in soybean are affected by exposure of the cotyledons to light. *Plant Physiol* **75**:90-94
86. **Mamidipudi V, Zhang J, Lee KC, Cartwright CA** (2004). RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src activity. *Mol Cell Biol* **24**:6788-6798
87. **Martin AC, del Pozo JC, Iglesias J, Rubio V, Solano R, de La Pena A, Leyva A, Paz-Ares J** (2000). Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J* **24**:559-567
88. **Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M** (1999). Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol* **121**:97-111
89. **McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ** (2002). The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol* **62**:1261-1273
90. **McKhann H, Frugier F, Petrovics G, Coba de la Peña T, Jurkevitch E, Brown S, Kondorosi E, Kondorosi A, Crespi M** (1997). Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): a role in hormone mediated cell division? *Plant Mol Biol* **34**:771-780
91. **Mellor RB** (1989) Bacteroids in the *Rhizobium*-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: implications for other microbial endosymbioses. *J Exp Bot* **40**:831-839
92. **Mergaert P, Montagu M, Holsters M** (1997). Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol Microbiol* **25**:811-817
93. **Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A, Kondorosi E** (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *P Natl Acad Sci USA* **103**:S230-S235
94. **Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J** (1994). Effects of Temperature Stress on Bean-Nodulating *Rhizobium* Strains. *Appl Environ Microbiol* **60**:1206-1212
95. **Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GE, Long SR** (2004). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *P Natl Acad Sci USA* **101**:4701-4705
96. **Miwa H, Sun J, Oldroyd G, Downie JA** (2006). Analysis of calcium spiking using a chameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J* **48**:883-894
97. **Mok DWS, Mok MC** (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:89-118
98. **Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C** (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. *Nature* **411**:948-950

99. **Nakaminami K, Hill K, Perry SE, Sentoku N, Long JA, Karlson D** (2009). *Arabidopsis* cold shock domain proteins: relationships to floral and silique development. *J Exp Bot* **60**:1047-1062
100. **Nakashima A, Chen L, Thao NP, Fujiwara M, Wong HL, Kuwano M, Umemura K, Shirasu K, Kawasaki T, Shimamoto K** (2008). RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* **20**:2265-2279
101. **Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF** (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**:297-300
102. **Newcomb W, Sippel D, Peterson RL** (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can J Bot* **57**:2603-2616.
103. **Nielsen N, Beilinson V, Bassüner R, Reverdatto S** (2001). A G β -like protein from soybean. *Physiol Plantarum* **111**:75-82
104. **Nilsson J, Sengupta J, Frank J, Nissen P** (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* **5**:1137-1141
105. **Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K, Kawaguchi M** (2002). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* **420**:426-429
106. **Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, Kawaguchi M** (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol* **50**:67-77
107. **Oke V, Long SR** (1999). Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr Opin Microb* **2**:641-646
108. **Oldroyd G, Downie A** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with *Rhizobium* infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**:519-546
109. **Oldroyd G, Engstrom E, Long S** (2001). Ethylene inhibits the nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **13**:1835-1849
110. **Oldroyd GE** (2007). Nodules and hormones. *Science* **315**:52-53
111. **Oldroyd GED, Downie JA** (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature Rev* **5**:566-576
112. **Osmanagic-Myers S, Wiche G** (2004). Plectin-RACK1 (receptor for activated C kinase 1) scaffolding. *J Biol Chem* **279**:18701-18710
113. **Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S, Iaccarino M** (2002). Key role of bacterial NH $_4^+$ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microb Mol Biol Rev* **66**:203-222
114. **Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S, Laccarino L** (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Intl Rev Cytol* **234**:201-262
115. **Patterson RL, van Rossum DB, Barrow RK, Snyder SH** (2004). RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca $^{2+}$ release. *P Natl Acad Sci USA* **101**:2328-2332
116. **Pawlowski K, De Vries S, Bisseling T** (1994). Isolation of total polyA and polysomal RNA from plant. *Plant Mol Biol Manual* D51-13
117. **Pawson T, Nash P** (2003). Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**:445-452
118. **Peck MC, Fisher RF, Long SR** (2006). Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bac* **188**:5417-5427

119. **Pérez GJC, Coussens G, De Keyser A, De Rycke R, De Bodt S, Van De Velde W, Goormachtig S, Holsters M** (2010). Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **152**:1574-1584
120. **Pii Y, Crimi M, Cremonese G, Spena A, Pandolfini T** (2007). Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol* **7**:21
121. **Radutoiu S, Madsen L, Madsen E, Felle H, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**:585-592
122. **Rao DLN, Giller KE, Yeo AR, Flowers TJ** (2002). The effects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann Bot* **89**:563-570
123. **Riely BK, Lougnon G, Ane JM, Cook DR** (2007). The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. *Plant J* **49**:208-216
124. **Roche P, Maillet F, Plazanet C, Debelle F, Ferro M, Truchet G, Promé JC, Dénarié J** (1996). The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:15305-15310
125. **Rolfe BG, Gresshoff PM** (1988). Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**:297-319.
126. **Roth E, Jeon K, Stacey G** (1988). Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Palacios R, Verma DP. *American Phytopathol Soc* St. Paul, MN 220-225
127. **Sagi M, Fluhr R** (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* **141**:336-340
128. **Saito A, Fujii G, Sato Y, Gotoh M, Sakamoto M, Toda G, Hirohashi S** (2002). Detection of genes expressed in primary colon cancers by *in situ* hybridisation: overexpression of RACK 1. *J Clin Pathol-Mol Pathol* **55**:34-39
129. **Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, Kouchi H, Murooka Y, Szczyglowski K, Downie JA, Parniske M, Hayashi M, Kawaguchi M** (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **19**:610-624
130. **Salah IB, Albacete A, Andújar CM, Haouala R, Labidi N, Zribi F, Martínez V, Pérez-Alfocea F, Abdelly C** (2008). Response of nitrogen fixation in relation to nodule carbohydrate metabolism in *Medicago ciliaris* lines subjected to salt stress. *J Plant Physiol* **166**:477-488
131. **Schechtman D, Mochly-Rosen D** (2001). Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* **20**:6339-6347
132. **Schlaman HRM, Spalink HP, Okker RJH, Lugtenberg BJJ** (1989). Subcellular localization of the nodD gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bact* **171**:4686-4693
133. **Schultze M, Kondorosi A** (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Ann Rev Genetics* **32**:33-57
134. **Schweitzer LE, Harper JE** (1980). Effect of light, dark, and temperature on root nodule activity (acetylene reduction) of soybeans. *Plant Physiol* **65**:51-56

135. **Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CM, Nissen P, Frank J** (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Struct Mol Biol* **11**:957-962
136. **Shaw SL, Long SR** (2003). Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol* **132**:2196-2204
137. **Steele MR, McCahill A, Thompson DS, MacKenzie C, Isaacs NW, Houslay MD, Bolger GB** (2001). Identification of a surface on the beta-propeller protein RACK1 that interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PODE4D5. *Cell Signal* **13**:507-513
138. **Stougaard J** (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol* **124**:531-540
139. **Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczglowski K, Parniske M** (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**:959-962
140. **Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM** (2006). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* **46**:961-970
141. **Swaraj K, Sheokand S, Fernandez-Pascual MM, de Felipe MR** (2001). Dark-induced changes in legume nodule functioning. *Aust J Plant Physiol* **28**:429-438
142. **Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, Dreyfus B** (2001). Methylobacterial bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* **183**:214-220
143. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *P Natl Acad Sci USA* **76**:4350-4354
144. **Turgeon BG, Bauer WD** (1985). Ultrastructure of infection thread development during infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* **163**:328-349
145. **Turgeon BG, Bauer WD** (1982). Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Time course and cytology of the initial infection process. *Can J Bot* **60**:152-161
146. **Udvardi MK, Day DA** (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:493-523
147. **Udvardi MK, de Bruxelles G, Day D, Freund S, Greil F, Kaiser B, Laver D, Panter S, Simon U, Thomson R, Trevaskis B** (2002). Molecular biology of the peribacteroid membrane. *Curr Plant Sci Biotech Agric* **38**:365-366
148. **Ullah H, Scappini EL, Moon AF, Williams LV, Armstrong DL, Pedersen LC** (2008). Structure of a signal transduction regulator, RACK1, from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Sci* **17**:1771-1780
149. **van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel AA, Kijne JW** (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* **64**:88-94

150. **Vandamme P, Goris J, Chen WM, De Vos P, Willems A** (2002). "*Burkholderia tuberum* sp. Nov. And *Burkholderia phymatum* sp. Nov., nodulate the roots of tropical legumes". *Syst Appl Microbiol* **25**:507-512
151. **Verma D** (1992). Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* **4**:373-382
152. **Verma D, Delauney A** (1988). Root nodule symbiosis: Nodulins and nodulin genes. In *Plant Gene Research: Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes* 169-199
153. **Verma DPS, Kazazian V, Zogbi V, Bal AK** (1978). Isolation and haracterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J Cell Biol* **78**:919-936
154. **Vitousek PM, Cassman K, Cleveland C, Crews T, Field CB, Grimm NB, Howarth RW, Marino R, Martinelli L, Rastetter EB, Sprent JI** (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochem* **58**:1-45
155. **Wais RJ, Galera C, Oldroyd G, Catoira R, Penmetsa RV, Cook D, Gough C, Dénairé J, Long SR** (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *P Natl Acad Sci USA* **97**:13407-13412
156. **Wais RJ, Keating DH, Long SR** (2002). Structure-function analysis of Nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol* **129**:211-224
157. **Walker SA, Viprey V, Downie JA** (2000). Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers. *P Natl Acad Sci USA* **97**:13413-13418
158. **Yarwood SJ, Steele MR, Scotland G, Houslay MD, Bolger GB** (1999). The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *J Biol Chem* **274**:14909-14917

ANEXO 1

Publicación en *Physiologia Plantarum*

Islas-Flores T, Guillén G, Islas-Flores I, San Román-Roque C, Sánchez, Loza-Tavera H, Bearer E, Villanueva MA (2009). Germination behavior, biochemical features and sequence analysis of the RACK1/arcA homolog from *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* **137**:264-280

Germination behavior, biochemical features and sequence analysis of the RACK1/arcA homolog from *Phaseolus vulgaris*

Tania Islas-Flores^a, Gabriel Guillén^a, Ignacio Islas-Flores^b, Carolina San Román-Roque^a, Federico Sánchez^a, Herminia Loza-Tavera^c, Elaine L. Bearer^{d,#} and Marco A. Villanueva^{a,*,†}

^aDepartamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^bCentro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97200, Mexico

^cFacultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 DF, Mexico

^dDepartment of Pathology and Laboratory Medicine, Brown University, Providence, RI 02912, USA

Germination behavior, biochemical features and sequence analysis of the RACK1/arcA homolog from *Phaseolus vulgaris*

Tania Islas-Flores^a, Gabriel Guillén^a, Ignacio Islas-Flores^b, Carolina San Román-Roque^a, Federico Sánchez^a, Herminia Loza-Tavera^c, Elaine L. Bearer^{d,#} and Marco A. Villanueva^{a,*,†}

^aDepartamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^bCentro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán 97200, Mexico

^cFacultad de Química, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 DF, Mexico

^dDepartment of Pathology and Laboratory Medicine, Brown University, Providence, RI 02912, USA

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: marco@cmarl.unam.mx

Received 28 May 2009; revised 14 July 2009

doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01280.x

Partial peptide sequence of a 36 kDa protein from common bean embryo axes showed 100% identity with a reported β -subunit of a heterotrimeric G protein from soybean. Analysis of the full sequence showed 96.6% identity with the reported soybean G_{β} -subunit, 86% with RACK1B and C from *Arabidopsis* and 66% with human and mouse RACK1, at the amino acid level. In addition, it showed 85.5, 85 and 83% identities with arcA from *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis* (RACK1A) and *Nicotiana tabacum*, respectively. The amino acid sequence displayed seven WD40 domains and two sites for activated protein kinase C binding. The protein showed a constant expression level but the mRNA had a maximum at 32 h post-imbibition. Western immunoblotting showed the protein in vegetative plant tissues, and in both microsomal and soluble fractions from embryo axes. Synthetic auxin treatment during germination delayed the peak of RACK1 mRNA expression to 48 h but did not affect the protein expression level while the polar auxin transport inhibitor, naphthylphthalamic acid had no effect on either mRNA or protein expression levels. Southern blot and genomic DNA amplification revealed a small gene family with at least one member without introns in the genome. Thus, the RACK1/arcA homolog from common bean has the following features: (1) it is highly conserved; (2) it is both soluble and insoluble within the embryo axis; (3) it is encoded by a small gene family; (4) its mRNA has a peak of expression at the time point of germination stop and (5) its expression is only slightly affected by auxin but unaffected by an auxin transport blocker.

Abbreviations– aPKC, activated protein kinase C; IAA, indoleacetic acid; NPA, naphthylphthalamic acid; PBS, phosphate-buffered saline; RACK1, receptor for activated C kinase; SDS–PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; 2, 4-D, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid.

[†]Present address: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Prol. Avenida Niños Héroes S/N, Puerto Morelos, Quintana Roo 77580, Mexico

[#]Current address: Department of Pathology, University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, NM 87131, USA

The nucleotide sequences reported in this paper have been submitted to the GenBank under accession numbers EU906910 (cDNA) and FJ959041 (genomic + promoter).

Introduction

Germination and growth in plants are natural events that involve multiple molecular reactions within complex and highly regulated biochemical cascades, which will eventually give rise to a photosynthetic, autotrophic plant. The cytoskeleton and signal and adaptor proteins play key roles during those early stages and most of the plant and animal life cycle (Kost et al. 1999, Pawson and Scott 1997). Putative adaptor proteins that can be found in the genome database of *Arabidopsis* are gamma adaptins, and similar adaptor proteins of the clathrin complex, proteins similar to phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein-2, transcriptional adaptors, v-SNARE homologs and WD40 repeat proteins, among others (The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR). WD40 repeat proteins have evolved to be specifically designed to interact with other partners through their WD40 domains that assemble to form an interaction platform with a characteristic propeller shape (McCahill et al. 2002). The family of WD40 repeat proteins include the β -subunit of heterotrimeric G proteins, the Tup1 transcriptional repressor (Chen et al. 2004), the Prp4 splicing factor (Dalrymple et al. 1989), cdc4 (Mallet et al. 1994), the receptor for activated C kinase (RACK; McCahill et al. 2002) and the product of the auxin-regulated gene from cultured cells (*arcA*; Ishida et al. 1993). In plants, the G_{β} -subunit of the heterotrimeric G protein is one of the few β -propeller-type proteins that have been described and characterized, and an indirect role in auxin signaling has been reported in *Arabidopsis* (Ullah et al. 2003). Another protein potentially involved in signal-transduction through hormone signaling is the *arcA* protein of tobacco. The gene that encodes this protein was isolated from a subtraction library of cells subjected to auxin treatment (Ishida et al. 1993). Proteins with similar sequences were described as being expressed in roots, stems, cotyledons, true leaves, flowers and fruits of tomato (Kiyosue and Ryan 1999), and during nodulation in *Medicago sativa* (McKhann et al. 1997). This gene named *Msgb1* was expressed in young embryos and in leaves, and was induced in roots after cytokinin treatment. Interestingly, the transcript was most abundant in dividing cells of nodule primordia and in the nodule meristem, suggesting a role in hormone-mediated cell division. In addition, a putative G_{β} -subunit of the heterotrimeric G protein from *Glycine max* has also been reported (Nielsen et al. 2001), but the protein showed only three N-terminal amino acids upstream the first WD repeat. Therefore, the protein lacks the amino acids that form the α -helical sequence at the N-terminal that a true G_{β} requires for interaction with the G_{α} -subunit (Chen et al. 2006,

Nielsen et al. 2001). The sequences of the *arcA*, *Msgb1* and *G. max* G_{β} proteins are also more related to the receptor for activated protein kinase C (RACK1) homolog from *Homo sapiens* and mouse than to the canonical G_{β} from *Arabidopsis*, and thus are more likely to have functions related to this scaffolding protein. In fact, the *Arabidopsis* genome contains three genes encoding RACK- or *arcA*-related proteins besides the canonical G_{β} sequence. RACK1 proteins play key roles in signal-transduction cascades in animal cells, which range from cytoskeleton rearrangements (Osmanagic-Myers and Wiche 2004) to protein translation regulation (Nilsson et al. 2004). Recently, the function of the *RACK1A* gene, the homolog of *arcA* in *Arabidopsis*, was studied in loss-of-function mutants (Chen et al. 2006). These mutants showed numerous defects in developmental processes that included seed germination, leaf production and flowering. During seed germination, they had a low sensitivity to brassinosteroids and gibberellin, and hypersensitivity to abscisic acid. It was concluded that *RACK1A* from *Arabidopsis* is involved in multiple signal-transduction processes that are also related to auxin. Furthermore, in a recent study, triple *RACK* *Arabidopsis* mutants were barely able to survive at early growth stages and could not survive until maturity, although single and double mutants were viable and showed various degrees of developmental defects suggesting functional substitution (Guo and Chen 2008). As it appears that this protein plays a fundamental role in processes that lead to cell division and proliferation in both plants and animals, it is of great interest to characterize its homologs in various organisms, especially those that undergo active cell proliferation. In this work, we isolated a 36 kDa protein from common bean embryo axes whose internal partial peptide sequence showed 100% identity with a reported β -subunit of a heterotrimeric G protein. We obtained the full cDNA and genomic sequence of this protein, and identified it as the *RACK1* homolog from common bean. We describe here its sequence and inherent features, cell and tissue distribution, and its expression during normal germination and under synthetic auxin treatment.

Materials and methods

Plant material

Common bean (*Phaseolus vulgaris*, Negro Jamapa variety) seeds were sterilized with 10% bleach for 5 min with stirring, briefly rinsed with distilled water and added with 100% ethanol and further stirred for 1 min. They were then rinsed extensively with double distilled water. The embryo axes were then excised from dry seeds

with a sterile knife, dried on a paper towel and finely ground to a powder. This material was resuspended in the appropriate buffer for the isolation of the 36 kDa protein. In some cases, 15-day-old leaves or stems or 72 h post-imbibed roots were used for the preparation of extracts as described below.

Isolation and internal peptide sequence of the 36 kDa protein

All extraction procedures were carried out at 4°C. The embryo axis powder was resuspended at a ratio of 0.02 g/ml of 10 mM phosphate buffer (PB; 2.8 mM NaH₂PO₄, 7.2 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). The suspension was stirred until completely hydrated and resuspended thoroughly. This suspension was then centrifuged at 15 000 g for 15 min and the supernatant was fractionated in a DEAE-Sephacel column (5.2 × 1 cm) previously equilibrated in PB. The column was washed extensively with PB buffer and then eluted with a gradient of 0–0.4 M NaCl in PB. The first six-eluted fractions were pooled and concentrated, and this procedure was repeated several times to obtain enough protein for sequencing. The concentrated sample was run on SDS–PAGE gels, and stained with Coomassie blue, excised from the gel and then completely destained. The stained band was cut and sent for trypsin digestion and sequencing to the Harvard Microchemistry Facility of Harvard University (Harvard, MA). Sequencing was carried out by microcapillary reverse-phase HPLC nano-electrospray tandem mass spectrometry (μLC/MS/MS) on a Finnigan LCQ Deca quadrupole mass spectrometer.

Synthesis and antibody production against a peptide from the 36 kDa protein

A decapeptide from the amino terminal of the obtained sequences was chosen for synthesis and antibody production. The peptide with the sequence AIATPIDNSD and its corresponding antibody were custom ordered from Biosynthesis Inc. (Lewisville, TX). The decapeptide was conjugated to keyhole limpet hemocyanin for antiserum production in rabbits and the hyperimmune serum collected from the manufacturer. This antibody was termed anti-PA218. The specificity of the antibody was assessed by detecting a distinct 36 kDa band on total extracts from embryo axes extracts from both soybean and common bean, and no reaction with the pre-immune serum. In addition, the antibody specificity was tested in a peptide competition assay (see below).

cDNA sequence of RT–PCR and 3′-RACE fragments

Surface-sterilized and pre-washed common bean seeds were further washed (briefly) with diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water and air-dried. The embryo axes were dissected and placed immediately in a pre-chilled mortar containing liquid nitrogen in which a fine powder was prepared by grinding. Total RNA was extracted from this embryo axis powder with either the TriTM reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH) or the original method of Chomczynski and Sacchi (1987), and the final RNA pellet was resuspended in DEPC-treated sterile water and stored in aliquots at –70°C until use. This RNA was used as template, and complimentary DNA was synthesized using reverse transcriptase followed by amplification by the polymerase chain reaction (PCR) with the platinumTM PCR SuperMix and platinumTM Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The combinations of oligonucleotides for amplification were: (1) forward 5′-CTCTCATCCGACGGTCA-3′, reverse 5′-TGAAGCAGAGTGCATGGA-3′; (2) forward 5′-GCGTTTCAGCCCCAGCA-3′, reverse 5′-CTCCATCCGCACTCCA-3′ and (3) forward 5′-CACACCGACGTCGTGA-3′ or 5′-CACCATGGCGGAAGGACTCGTCCTGAAGG-3′, reverse 5′-ATAACGTCCAATTGCCAAAC-3′. For 3′-rapid amplification of cDNA ends (3′-RACE), the supplied adapter primer 5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)17-3′ was used for the cDNA synthesis, and the forward in (2) and abridged universal amplification primer 5′-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3′ were used for PCR according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). All PCR products were cloned with the TOPO TA cloningTM kit (Invitrogen) in the pCRTM2.1-TOPOTM vector. Both sense and antisense chains were amplified for sequence analysis. The amplified products were analyzed on 1.4% agarose gels run in the presence of ethidium bromide. Amplified and cloned cDNA products were purified using the QuiaPrepTM Spin miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA), and this DNA was sequenced in the sequencing facility of the Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Morelos, Mexico). The total sequence of the cDNA was obtained and analyzed with the Editview program (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequence was reported to the GenBank with accession number EU906910. For expression, amplified products were cloned in the pCRTM7/CT-TOPOTM vector (Invitrogen) and expressed in *Escherichia coli* cells.

Promoter sequence determination and analysis

The *PvRACK1* promoter was obtained from a promoter library. Genomic DNA was digested with the enzymes

EcoRV, *PvuI*, *StuI* and *DraI*. An adapter was placed at the 5'-end of fragments derived from the digestions to facilitate the amplification with specific primers. In order to amplify the *PvRACK1* promoter, two primers at the 5'-end in reverse were used. The first reaction was done with the primer 5'-CCGTAGGCTTGTCCCTCCTTGG-3' and the primer from the library adapter AP1 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'. The second reaction was carried out with the primer 5'-CCACAGGATGATGGATTTGTGCG-3' and the primer from the library adapter AP2 5'-ACTATAGGGCAGCGGTGGT-3'. The amplified fragments were sequenced at the sequencing facility of the Instituto de Biotecnología, UNAM. The sequence corresponding to the promoter region was searched for regulatory regions using the FASTA format of upstream genomic sequence adjacent to the *PvRACK1* coding region in a sequence comparison with the database of plant cis-acting regulatory DNA elements (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/; Higo et al. 1999) and the database of plant PolII promoter and start of transcription regions (<http://www.softberry.ru/berry.phtml>).

Phylogenetic tree assembly and construction

The phylogenetic tree was constructed using Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunit β -like amino acid sequences with the highest identity to RACK, collected from the GenBank for the following species: *Aedes aegypti* (AEDAE), *A. gambiae* (AEDGA), *Apis mellifera* (APIME), *Arabidopsis thaliana* (ARATH), *Aspergillus clavatus* (ASPCL), *A. fumigatus* (ASPFU), *A. nidulans* (ASPNI), *A. oryzae* (ASPOR), *Biomphalaria glabrata* (BIOGL), *Blattella germanica* (BLAGE), *Bombyx mori* (BOMMO), *Brassica napus* (BRANA), *Canis familiaris* (CANFA), *Chaetomium globosum* (CHAGL), *Chlamydomonas incerta* (CHLIN), *C. reinhardtii* (CHLRE), *Choristoneura fumiferana* (CHOFU), *Coprinopsis cinerea* (COPCI), *Cryptococcus neoformans* (CRYNE), *Danio rerio* (DANRE), *Drosophila melanogaster* (DROME), *D. pseudoobscura* (DROPS), *Euprymna scolopes* (EUPSC), *Fusarium oxysporum* (FUSOX), *Gallus gallus* (GALGA), *Gibberella zeae* (GIBZE), *G. max* (GLYMA), *Heliothis virescens* (HELVI), *Homalodisca coagulata* (HOMCO), *H. sapiens* (HOMSA), *Hydra vulgaris* (HYDVU), *Ixodes scapularis* (IXOSC), *Lentinula edodes* (LENED), *Lethenteron japonicum* (LETJA), *Macaca mulatta* (MACMU), *Maconellicoccus hirsutus* (MACHI), *Magnaporthe grisea* (MAGGR), *Mamestra brassicae* (MAMBR), *M. sativa* (MEDSA), *Metarhizium anisopliae* (METAN), *Mus musculus* (MUSMU), *Mya arenaria* (MYAAR), *Neosartorya fischeri* (NEOFI), *Neurospora crassa* (NEOCR), *Nicotiana glauca* (NICGL), *N. tabacum* (NICTA), *Oreochromis mossambicus* (OREMO), *O. niloticus*

(ORENI), *Ostreococcus lucimarinus* (OSTLU), *O. tauri* (OSTTA), *Oryctolagus cuniculus* (ORYCU), *Oryza sativa* (ORYSA), *Pan troglodytes* (PANTR), *Paralichthys olivaceus* (PAROL), *Petromyzon marinus* (PETMA), *P. vulgaris* (PVRACK), *Plutella xylostella* (PLUXY), *Rattus norvegicus* (RATNO), *S. lycopersicum* (SOLLY), *S. tuberosum* (SOLTU), *Tetraodon nigroviridis* (TETNI), *Toxoptera citricida* (TOXCI), *Tribolium castaneum* (TRICA), *Ustilago maydis* (USTMA), *Xenopus laevis* (XENLA) and *X. tropicalis* (XENTR). The sequences were directed to ClustalX 1.8 (Thompson et al. 1997) for joint multiple alignment. The multiple alignment was sent to the PHYLIP 3.57 package (Lim and Zhang 1999). Within this package, we input the aligned sequences into the SEQBOOT algorithm (bootstrap sequence data sets) to create 100 data sets by bootstrap resampling. These data sets were entered into PROTDIST to generate 100 protein distance matrices. These matrices were entered into the program NEIGHBOR to produce 100 phenograms of the *PvRACK1* sequences using the neighbor-joining method, followed by the creation of majority-rules, strict consensus and unrooted tree with confidence intervals using CONSENSE. The resulting phylogenetic tree was displayed and edited in the SplitsTree4 program (Huson and Bryant 2006).

SDS-PAGE western blot analysis and peptide competition assay

Dissociating polyacrylamide gels were prepared at a final concentration of 12% according to Laemmli (1970). Gels were run at 30 mA and Coomassie blue- or silver-stained. SDS-PAGE gels were transferred to nitrocellulose (Towbin et al. 1979). For immunoblotting, the nitrocellulose membranes were blocked for 1 h at 50°C in 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS (2.8 mM NaH₂PO₄, 7.2 mM Na₂HPO₄, 0.14 M NaCl, pH 7.4), followed by incubation overnight at 4°C with anti-PA218 antibodies diluted 1:5000–1:10 000 in PBST (PBS added with 0.05% Triton X-100 or Tween-20). The blots were then washed three times with PBST and incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG, diluted 1:3500 in PBST for 2 h at 25°C. The membranes were washed three times with PBST, rinsed briefly in PBS and the antigen-antibody complex was detected with bromo chloro indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium according to the manufacturer (Roche Laboratories, Nutley, NJ).

For the peptide competition assay, excess molar amounts of peptide:anti-PA218 antibody at 1:1, 100:1 and 200:1, were pre-incubated overnight at 4°C, followed by the usual western blot procedure.

Soluble and microsomal fraction analysis

For this preparation, embryo axis powder was resuspended at a ratio of 0.2 g/ml of PBS-C (PBS containing the commercial protease inhibitor cocktail tablet, Complete™; Roche Laboratories; according to the manufacturer's instructions). The suspension was stirred at 4°C as described above. The suspension was centrifuged at 20 800 *g* for 10 min at 4°C to collect the total microsomal fraction in the supernatant. The supernatant was then centrifuged at 100 000 *g* for 30 min at 4°C, and the supernatant was taken as the soluble fraction whereas the pellet was considered the total microsomal fraction. Part of this pellet was resuspended in PBS and stored for further analysis. The other part was resuspended in 0.5 M KCl-PBS and incubated for 20 min at 4°C to release ionically bound proteins. This fraction was again centrifuged at 100 000 *g* for 30 min at 4°C. The supernatant was stored for further analysis and the pellet was resuspended in 0.5% TX-100 in PBS and incubated for 20 min at 4°C to release intrinsically membrane bound proteins. This fraction was again centrifuged at 100 000 *g* for 30 min at 4°C. The supernatant was stored for further analysis and the pellet was resuspended in 0.1 M Na₂CO₃ and incubated for 20 min at 4°C to release intrinsically bound proteins in luminal and folded membranes. This fraction was again centrifuged at 100 000 *g* for 30 min at 4°C. The supernatant was stored for further analysis, and the pellet was resuspended in Laemmli's sample buffer (Laemmli 1970) and heated for 5 min at 95°C to release all the proteins that remained in the cell matrix and which were not released by the previous treatments. All the fractions were standardized for protein in Coomassie blue-stained SDS-PAGE gels and then analyzed by western blot with the anti-PA218 antibody.

Western blot analyses of three plant species and various tissues of *P. vulgaris*

Seeds from *P. vulgaris* and *G. max* were surface-sterilized as described above, and a powder from their embryo axes was obtained with a mortar and pestle. This powder was made into an extract by hydrating and resuspending in PBS-C, followed by centrifugation as described above. Whole *Pisum sativum* seeds were obtained directly from pods and frozen in liquid nitrogen. Twenty-one-day-old nodules from *P. vulgaris* plants inoculated with the *Rhizobium etli* CIAT899 strain were collected from roots and frozen in liquid nitrogen. Likewise, roots, stems and leaves from 15-day-old *P. vulgaris* plants, and pods from various developmental stages, were also collected and frozen in liquid nitrogen. All frozen tissues were made into a powder in the presence of liquid nitrogen and resuspended in PBS-C

to make a total protein extract as described above. The obtained supernatants from all extracts were quantitated for protein by the Bradford (1976) assay and then mixed with Laemmli's sample buffer (Laemmli 1970) and heated for 5 min at 95°C prior to electrophoresis and western blot analysis.

Western and northern blot analyses of *P. vulgaris* embryo axes and hypocotyls during germination

Surface-sterilized seeds from *P. vulgaris* were placed on sterile trays lined with wet paper towels for germination in the dark at 24°C ± 1. Common bean embryo axes or hypocotyls from the seedlings were dissected at various stages of germination, frozen in liquid nitrogen and homogenized to a powder as described above. For protein analysis, the powder was extracted with PBS-C and the soluble supernatants quantified for protein with the Bradford assay (Bradford 1976). The presence of protein at various post-imbibition times was detected by western blot with anti-PA218 antibodies. For RNA analysis, RNA extracted as described above from the various post-imbibition times was quantified and loaded in equal amounts on 1.4% agarose gels. After separation, the gels were rinsed sequentially in 1 × MOPS, 10 × SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na Citrate) and 20 × SSC, and transferred to Hybond-N™ nylon membranes (Amersham, Piscataway, NJ). The membranes were incubated with a pre-hybridization solution containing 0.1% BSA, 7% SDS, 0.52 M NaH₂PO₄, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.5 and incubated 1 h at 55°C. The membrane was then incubated for 24 h at 55°C with a 500 bp cDNA fragment labeled with [³²P]- γ -ATP using the Rediprime™ II from Amersham according to the manufacturer's instructions.

For auxin and auxin transport inhibitor treatment, seeds were germinated in wet paper towel-lined trays in the dark at 24 ± 1°C but these were damped and irrigated with either 25 μ M 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), 50 μ M indoleacetic acid (IAA) or 25 μ M naphthylphthalamic acid (NPA). The embryo axes or hypocotyls were collected at various times during the germination period and processed for western and northern blot analyses as described above.

Southern blot and genomic DNA PCR amplification

Total genomic DNA was extracted by the cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson 1980), and 30 μ g were digested overnight at 37°C with 30–40 U of either *Bgl*II, *Ban*I or *Kpn*I. The next day the digested DNA was precipitated and separated in a 1% agarose gel. The gel was transferred to

a nylon membrane (Hybond-N, Amersham) by diffusion for 24 h in 0.4 M NaOH. The membrane was then washed with 2× SSC for 5 min at 25°C, placed in a tube with pre-hybridization solution [5× Denhardt's solution (4% Ficoll, 4% polyvinylpyrrolidone (PVP), 4% BSA), 5× SSC, 1% SDS and 100 µg ml⁻¹ salmon sperm DNA], and agitated continuously for 2 h at 42°C. Then, the solution was discarded, and the radioactive cDNA probe ([³²P]-γ-ATP 936 bp's *PvRACK1* DNA) was added in the pre-hybridization solution but without the salmon sperm DNA and incubated 24 h at 50°C with continuous agitation. After this time, the solution was discarded and the membrane washed extensively with 0.1% SDS in 4× SSC, and then with 0.1% SDS in 0.1× SSC until no signal was detected at the edges of the membrane. The membrane was air-dried and the radioactively labeled bands detected on a Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

The genomic DNA PCR amplification was carried out using an Invitrogen AccuPrime™ SuperMix II kit (Invitrogen) with the oligonucleotides forward *PvRACK5'*-CACC (5'-CACCATGGCGGAAGGACTCGTCCTG-3') and reverse *PvRACK3'*-TAG (5'-CTAATAACGTCCAATTGCCAAACTCTGACC-3'). The reaction mixture was prepared with 12.5 µl AccuPrime SuperMix II, 0.5 µl 10 µM *PvRACK5'*-CACC, 0.5 µl 10 µM *PvRACK3'*-TAG, 1 µl (100 ng µl⁻¹) *P. vulgaris* genomic DNA, 10.5 µl H₂O. The reaction was carried out by incubating 2 min at 94°C followed by 35 amplification cycles as follows: denaturing at 94°C for 15 s; alignment at 55–60°C for 15 s and extension at 68°C for 3 min. The PCR product was cloned into a TOPO™ TA cloning kit (Invitrogen) and sent for sequencing to the sequencing facility of the Instituto de Biotecnología-UNAM.

Results

A 36 kDa protein from *P. vulgaris* is related to proteins with β-propeller-type structure and possesses seven WD40 domains

The enriched 36 kDa protein from bean embryo axes was run on a denaturing gel and sent for internal peptide sequencing. Table 1 shows the obtained four internal sequences that, after a blast against the GenBank (Altschul et al. 1997), were 100% identical to a sequence more closely related to RACK1 but reported as a G_β-like subunit of a heterotrimeric protein from *G. max* (GenBank accession numbers: Gene LOC547868; nucleotide U44850.1; protein AAB05941.1). An internal peptide from the sequence closest to the N-terminus was used to raise an antibody in rabbits (Table 1, underlined amino acids; see below). RT-PCR and 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) using oligonucleotides

Table 1. Comparison and alignment of the partial amino acid sequences of the 36 kDa protein from *Phaseolus vulgaris* embryo axes, with the reported G_β-like subunit of a heterotrimeric protein from *Glycine max* (accession number AAB05941.1). *The underlined sequence corresponds to the peptide against which antibodies were raised in rabbits.

Species	Amino acid sequence
Sequence number 1	
<i>P. vulgaris</i>	AHTDVVTA <u>IA</u> IPIDNSDMIVTASR*
<i>G. max</i>	13 AHTDVVTAIAIPIDNSDMIVTASR 36
Sequence number 2	
<i>P. vulgaris</i>	LWDLAAGTSAR
<i>G. max</i>	89 LWDLAAGTSAR 99
Sequence number 3	
<i>P. vulgaris</i>	FSPSTLQPTIVSASWDR
<i>G. max</i>	157 FSPSTLQPTIVSASWDR 173
Sequence number 4	
<i>P. vulgaris</i>	IWDLESK
<i>G. max</i>	261 IWDLESK 267

derived from the obtained sequences allowed us to obtain the full cDNA sequence that encodes the 36 kDa protein (Fig. 1). This sequence has been deposited in the GenBank under accession number EU906910. The GenBank annotated cDNA sequence of *PvRACK1* was initially obtained by RT-PCRs with primers based on the reported soybean G_β-subunit-like sequence; for this reason, the *PvRACK1* 5' cDNA had several nucleotide changes. The sequencing of *PvRACK1* genomic DNA allowed us to obtain the real 5' RACK1 sequence which had nucleotide changes at positions 6, 9, 12, 18, 21, 22, 23, 24 and 27 (G/A, A/G, A/T, C/T, G/C, A/C, A/G, G/C and A/C, respectively). However, despite these differences, there was only one change at position 8 (K to R) at the amino acid level. This corrected sequence is showed in Fig. 1. The sequence shows seven WD40 repeats (Fig. 1, boxed sequences in white and gray), and two internal sequences (Fig. 1, underlined sequences) that represent the conserved activated protein kinase C (aPKC) binding domains. Table 2 shows an analysis comparing this and other reported similar sequences from the GenBank. This analysis revealed that the closest identities were 96.6% with the *G. max* RACK1-related sequence reported as G_β-like subunit of a heterotrimeric protein, 96% with *M. sativa* *Msgb1*, and 82–87% identities with various reported proteins that included the arcA homologs of *A. thaliana* (RACK1A; ARATH3 in Table 2) and *N. tabacum*, and RACK1B and C (ARATH2 and 1 in Table 2, respectively) from *A. thaliana* and *B. napus* BGB1. Lower, nonetheless significant identities (46–69%) were found with proteins from other organisms including *O. tauri* and *C. reinhardtii* (Table 2). In addition, a separate analysis yielded 66% identity of the common bean protein with RACK1 from human


```

1  atg gca gag ggt ctc gtt ctc cgc ggc acc atg cgc gcc cac acc gac gtc gtg acg gcg att
1  M A E G L V L R G T M R A H T D V V T A I
64  gcc act ccc att gac aac tcc gac atg att gtc acg gcg tcg cgc gac aaa tcc atc atc ctg
22  A T P I D N S D M I V T A S R D K S I I L
127  tgg caa ctc acc aag gag gac aag acc tac ggt gtc ccc cgc cgc cgt ttg acc gcc cac tcc
43  W Q L T K E D K T Y G V P R R R L T G H S
190  cac ttc gtt cag gac gtc gtt ctc tct tcc gac ggt cag ttt gcg ctc tcc gcg tcc tgg gac
64  H F V Q D V V L S S D G Q F A L S G S W D
253  gcc gaa ctc cgc ctc tgg gac ctt gcc gcc gcc act tcc gcg cgc cgc ttt gtc gcc cac acc
85  G E L R L W D L A A G T S A R R F V G H T
316  aag gac gtg ctc tcc gtg gcg ttc tcc atc gac aac cgt cag atc gtg tcg gcg tca cgt gac
106  K D V L S V A F S I D N R Q I V S A S R D
379  cgc acg atc aag ctg tgg aac acc ctt ggt gaa tgc aag tac acc att caa gac agc gac gct
127  R T I K L W N T L G E C K Y T I Q D S D A
442  cat tct gat tgg gtt agc tgc gtg cgt ttc acc ccc agc acg ctt cag ccg act att gtg tct
148  H S D W V S C V R F S P S T L Q P T I V S
505  gca tct tgg gac cgt act gtg aag gta tgg aat ctc acg aac tgc aaa ctg aga aac act ctt
169  A S W D R T V K V W N L T N C K L R N T L
568  gct gga cac agt ggg tat gtg aac act gtt gct tct tct ccc gat ggt tct ctt gtc gcc agt
190  A G H S G Y V N T V A V S P D G S L C A S
631  ggt ggg aaa gat gga gtt att ttg ctg tgg gat ttg gct gag ggt aag cgt ctt tac tct ctt
211  G G K D G V I L L W D L A E G K R L Y S L
694  gat gct ggc tct att atc cat ccc ctc tgc ttc agt ccc aac agg tac tgg ctt gtc gcc gcc
232  D A G S I I H A L C F S P N R Y W L C A A
757  acc gag cag agc atc aag atc tgg gat ttg gag agt aag agt atc gtt gag gat ttg aag gta
253  T E Q S I K I W D L E S K S I V E D L K V
820  gac ctc aag act gag gct gat ggt acc act ggt gga aac aca aac aaa aag aag gtt atc tat
274  D L K T E A D G T T G G N T N K K K V I Y
883  tgt acg agt ttg aac tgg agt gca gat gga agc act ttg ttt agt ggt tat acc gat gcc gtg
295  C T S L N W S A D G S T L F S G Y T D G V
946  gtc aga gtt tgg gca att gga cgt tat tag 972
316  V R V W A I G R Y - 324

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the cDNA that encodes *PvRACK1* and its translated amino acid sequence. The 972 nucleotides translate into 324 amino acids for a protein of approximately 36 kDa. The amino acid sequence shows seven domains containing the WD40 sequence (boxed amino acids in white and gray) and two internal sequences representing the PKC binding domains (underlined amino acids).

and mouse (data not shown). The common feature of all these proteins was the presence of WD40 domains in their sequence. In contrast, comparison with the canonical G_{β} -subunit of a heterotrimeric protein from *A. thaliana* (At4g34460.1) showed only 25% identity at the amino acid level (data not shown). The two internal aPKC binding sequences of the common bean protein also showed a strong identity with equivalent aPKC binding sequences in other RACK homologs and 100% identity with the RACK1 sequence reported as G_{β} -like protein from *G. max* (Table 3). The first internal aPKC binding sequence from *PvRACK1* was identical to the equivalent sequence of the RACK1 sequence reported as G_{β} -like protein from *G. max* and other reported aPKC binding sequences from *H. Sapiens*. It also showed 85.7 and 57% identity to equivalent sequences from *Trypanosoma cruzi*, and *Saccharomyces cerevisiae* and *S. pombe*, respectively (Table 3). The second internal sequence showed a close identity with plant and mammalian homologs but very low identity with unicellular eukaryotes (Table 3). These data show that the sequence from *P. vulgaris* as well as the *G. max* sequence reported as a G_{β} -like subunit of a heterotrimeric protein is more closely related to RACK1 and arcA proteins. Therefore, we hereby term this protein *PvRACK1*.

PvRACK1* is related to other WD40 domain-containing proteins from species having multigene families but is represented by a small gene family in *P. vulgaris

The sequence of *PvRACK1* and other similar sequences from the GenBank were organized into a phylogenetic tree in order to reveal how it relates with the various orthologs in different species and kingdoms. The resulting phylogenetic tree showed that *PvRACK1* (Fig. 2) clusters in a family of sequences from dicotyledoneous legume plants most closely related to *G. max* and *M. sativa* (GLYMA and MEDSA in Fig. 2, respectively) and forms a separate but closely related branch with other dicots such as *A. thaliana* and *B. napus* (ARATH and BRANA in Fig. 2, respectively), both of them appearing to share a common ancestor (Fig. 2A). Plant sequences from other non-legume dicots group in more distant but adjacent branches within the same cluster (Fig. 2A). The two most distant adjacent branches within the same cluster belong to fungi (Fig. 2F) and the unicellular algae *Chlamydomonas* and *Ostreococcus* spp (Fig. 2B). The most distant and distinct clusters in the tree, as expected, belong to sequences from the animal kingdom including humans and insects (Fig. 2D, E, respectively). This result shows that *PvRACK1* is more closely related to legume

Table 3. Comparison of the identities of the internal aPKC binding sequences of PvRACK1 with other reported sequences, including that of the reported G β -like subunit of a heterotrimeric protein from *Glycine max*.

Identities species	RACK1 sequence in third domain	Percentage identity with PvRACK1	RACK1 sequence in sixth domain	Percentage identity with PvRACK1
PvRACK1 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	DVLSVAF		SIHALFC	
G β -like (<i>G. max</i>)	DVLSVAF	100	SIHALFC	100
arcA (<i>Nicotiana tabacum</i>)	DVLSVAF	100	SIHSFLC	87.5
AtarcA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	DVLSVAF	100	SIHSFLC	87.5
RACK1 (<i>Homo sapiens</i>)	DVLSVAF	100	DIINALCF	75
RACK1 (<i>Mus musculus</i>)	DVLSVAF	100	DIINALCF	75
RACK1 (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	DVLSVTF	85.7	APINQICF	37.5
Asc1p/Cpc2 (<i>Saccharomyces cerevisiae/S. pombe</i>)	DVMSVDI	57	DEVFSLAF	33.3

ARR1-binding element (ARRIAT Element, Fig. 4), a-300 regulatory element sequence (-300 element, Fig. 4), a *telo* box (*telo* box, Fig. 4) and several TCP domain protein binding (Site II) element regions (SITEIIATCYTC element, Fig. 4). These data suggest that PvRACK1 expression is under the control of several regulatory elements.

Tissue distribution and cross-reactivity of PvRACK1 with an antibody raised against a decapeptide from within the 36 kDa protein sequence

The anti-PA218 antibody, which was raised against a synthetic decapeptide from the obtained partial peptide amino acid sequence (Table 1, underlined amino acids), immunostained a 36 kDa protein present in total extracts from common bean (Fig. 5A, lane 2). In a peptide competition assay, immunostaining of the 36 kDa common bean protein was gradually inhibited by increasing excess molar amounts of the synthetic decapeptide incubated with the antibody prior to immunoblotting (Fig. 5A, lanes 5–7). Thus, the antibody was highly specific inasmuch as it could recognize the sequence of the decapeptide on the protein, against which the anti-PA218 antibody was raised. The anti-PA218 antibody also cross-reacted with a 36 kDa protein in soybean (Fig. 5A, lane 3), and pea (Fig. 5A, lane 4), indicating that similar proteins are present in other plant species. Further analysis showed that the anti-PA218 antibody was also able to recognize the 36 kDa protein in all tissue extracts at equal amounts of protein from common bean, loaded on a polyacrylamide gel and tested by western blot. All tissues showed a well detectable amount of the protein, which was found present in root nodules, roots, stems, leaves and pods (Fig. 6A, lanes 1–5, respectively), with slightly higher amounts in leaf tissue (Fig. 6A, lane 4). These data indicated that the antibody is specific, and that the protein is present in other plant species and is ubiquitous in all common bean tissues.

The PvRACK1 protein is present throughout differentially extracted fractions from common bean embryo axes

The common bean embryo axes were separated into a microsomal and a soluble fraction, and the microsomal fraction was subjected to differential extraction using salts and detergents (see section on Materials and methods). The resulting fractions were analyzed by western immunoblotting using the anti-PA218 antibody, and the analysis showed significant immunostaining in all fractions tested. First, the antibody detected the protein in both insoluble (Fig. 7, lane 1) and soluble (Fig. 7, lane 2) fractions from the microsomal preparation. Second, the soluble fraction from KCl-extracted microsomes showed a clear presence of the protein as well (Fig. 7, lane 3). Third, soluble detergent fractions from TX-100-extracted microsomes (previously extracted with KCl), also showed the presence of the protein (Fig. 7, lane 4). Next, the salt- and detergent-extracted microsomal pellet was further extracted with Na₂CO₃ and the carbonate-extracted soluble fraction showed a significant presence of the protein (Fig. 7, lane 5). Finally, the resulting carbonate-extracted insoluble pellet, which was further resuspended in Laemmli's denaturing sample buffer and boiled, also showed immunostaining of the 36 kDa band (Fig. 7, lane 6). As a positive control, the total low-speed PBS supernatant from common bean embryo axes was run in parallel to show that the antibody also immunostained the 36 kDa band (Fig. 7, lane 7). These data indicate that the protein is ubiquitously distributed in the cell and it shows no special predominance in soluble, membrane-enriched, or detergent-resistant cell matrix fractions.

PvRACK1 protein is expressed steadily during early germination times but its mRNA is accumulated with a maximum at the end of germination

The anti-PA218 antibody was used to analyze the expression pattern of the PvRACK1 protein at various

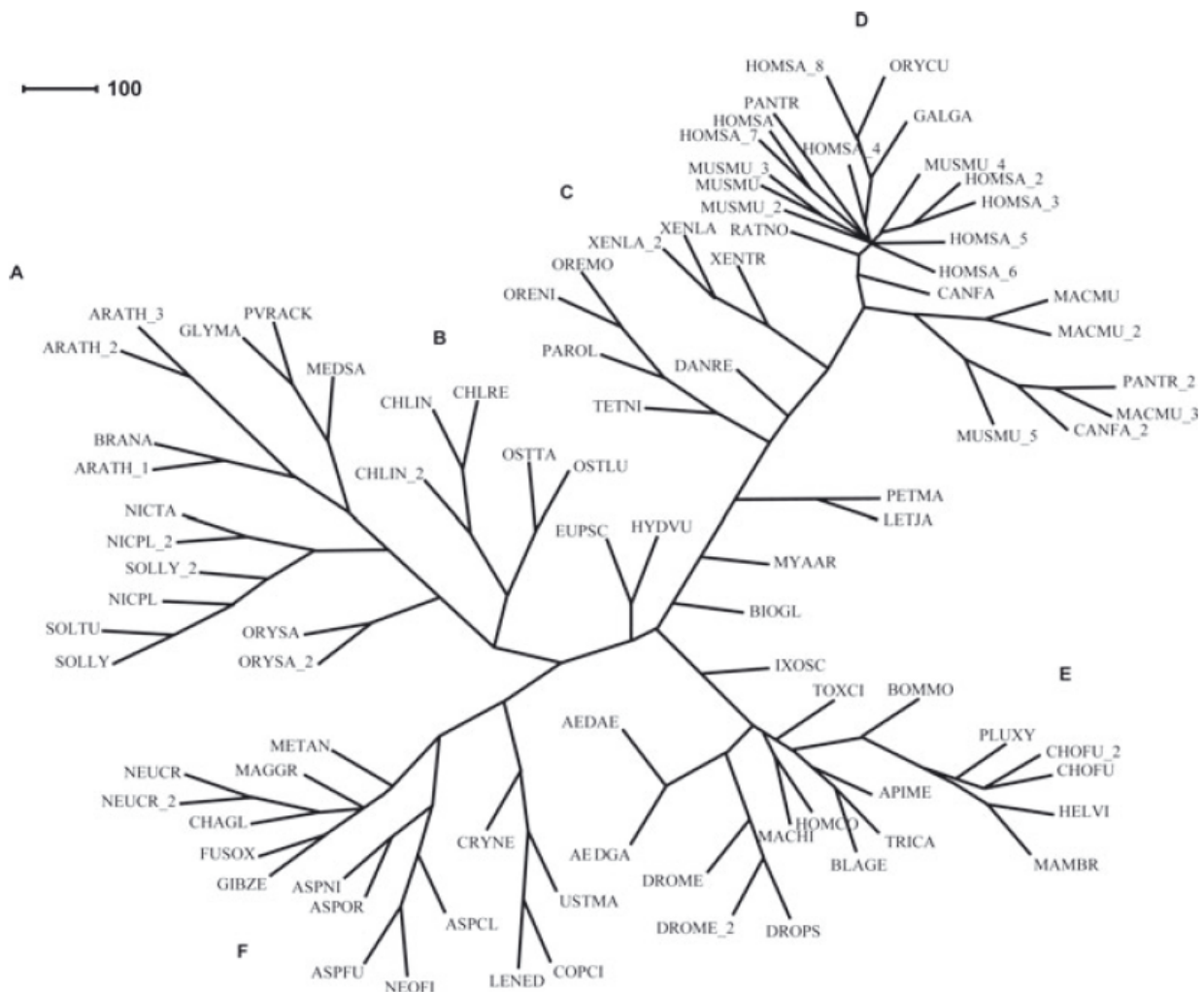


Fig. 2. Phylogenetic tree of the PvRACK1 protein. The phylogenetic tree of RACK1 protein sequences was constructed based on Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunit β -like amino acid sequences with the highest identity to RACK, collected from the GenBank for the following species: *Aedes aegypti* (AEDAE), *A. gambiae* (AEDGA), *Apis mellifera* (APIME), *Arabidopsis thaliana* (ARATH), *Aspergillus clavatus* (ASPCL), *A. fumigatus* (ASPFU), *A. nidulans* (ASPNI), *A. oryzae* (ASPOR), *Biomphalaria glabrata* (BIOGL), *Blattella germanica* (BLAGE), *Bombyx mori* (BOMMO), *Brassica napus* (BRANA), *Canis familiaris* (CANFA), *Chaetomium globosum* (CHAGL), *Chlamydomonas incerta* (CHLIN), *C. reinhardtii* (CHLRE), *Choristoneura fumiferana* (CHOFU), *Coprinopsis cinerea* (COPCI), *Cryptococcus neoformans* (CRYNE), *Danio rerio* (DANRE), *Drosophila melanogaster* (DROME), *D. pseudoobscura* (DROPS), *Euprymna scolopes* (EUPSC), *Fusarium oxysporum* (FUSOX), *Gallus gallus* (GALGA), *Gibberella zeae* (GIBZE), *Glycine max* (GLYMA), *Heliothis virescens* (HELVI), *Homalodisca coagulata* (HOMCO), *Homo sapiens* (HOMSA), *Hydra vulgaris* (HYDVU), *Ixodes scapularis* (IXOSC), *Lentinula edodes* (LENED), *Lethenteron japonicum* (LETJA), *Macaca mulatta* (MACMU), *Maconellicoccus hirsutus* (MACHI), *Magnaporthe grisea* (MAGGR), *Mamestra brassicae* (MAMBR), *Medicago sativa* (MEDSA), *Metarhizium anisopliae* (METAN), *Mus musculus* (MUSMU), *Mya arenaria* (MYAAR), *Neosartorya fischeri* (NEOFI), *Neurospora crassa* (NEOCR), *Nicotiana plumbaginifolia* (NICPL), *Nicotiana tabacum* (NICTA), *Oreochromis mossambicus* (OREMO), *O. niloticus* (ORENI), *Ostreococcus lucimarinus* (OSTLU), *O. tauri* (OSTTA), *Oryctolagus cuniculus* (ORYCU), *Oryza sativa* (ORYSA), *Pan troglodytes* (PANTR), *Paralichthys olivaceus* (PAROL), *Petromyzon marinus* (PETMA), *Phaseolus vulgaris* (PVRACK), *Plutella xylostella* (PLUXY), *Rattus norvegicus* (RATNO), *Solanum lycopersicum* (SOLLY), *S. tuberosum* (SOLTU), *Tetraodon nigroviridis* (TETNI), *Toxoptera citricida* (TOXCI), *Tribolium castaneum* (TRICA), *Ustilago maydis* (USTMA), *Xenopus laevis* (XENLA) and *X. tropicalis* (XENTR). The tree was created as described in Materials and Methods; briefly, sequences were directed to ClustalX 1.8 (Thompson et al. 1997) and assembled with the PHYLIP 3.57 package (Lim and Zhang 1999) using the neighbor-joining method. The unrooted tree was created with CONSENSE. The resulting phylogenetic tree is displayed and edited in the SplitsTree4 program. The clusters correspond to: (A) plants; (B) unicellular algae; (C) amphibians and fishes; (D) mammals; (E) insects and (F) fungi. PvRACK1 clusters within the group of legume plant RACK proteins.

post-imbibition times. The protein was readily detectable in western blots from the extracts derived from the embryo axis at the seed stage (Fig. 8A, lane 0 h). This level of detection was more or less constant up to 40 h post-imbibition (Fig. 8A, lanes 0–40 h). In contrast, northern blot analysis of the same time points revealed

that, at initial stages, the mRNA is practically undetected (Fig. 8B, lane 0 h). The mRNA remained at low levels but slightly detectable after 12 h (Fig. 8B, lane 12 h) and steadily increased to become clearly detectable at 20 h (Fig. 8B, lane 20 h). The accumulation of mRNA reached a maximum at 32 h (Fig. 8B, lane 32 h), which

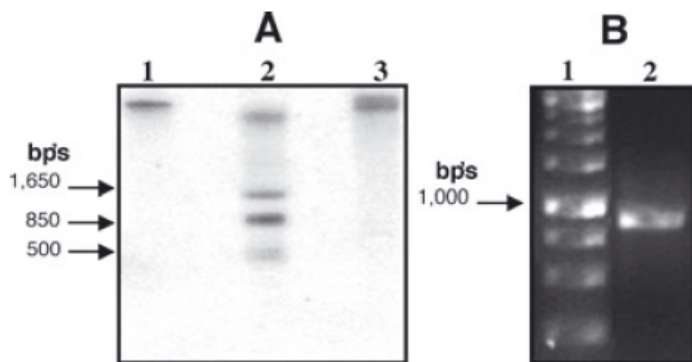


Fig. 3. (A) Southern blot of *Phaseolus vulgaris* DNA detected with a 936 bp's fragment from *PvRACK1*. The total DNA was digested with the restriction enzymes *Bgl*II, *Ban*I and *Kpn*I (lanes 1–3, respectively). *Ban*I showed a limited restriction pattern of three-four bands (lane 2), whereas *Bgl*II and *Kpn*I showed only one high molecular weight band (lanes 1 and 3, respectively). (B) Genomic PCR amplification of *P. vulgaris* DNA. After PCR amplification of *P. vulgaris* DNA with primers that anchor to the start and end of the cDNA *PvRACK1* sequence, a single approximately 975 bp band was obtained (right arrow), with identical sequence to *PvRACK* cDNA. The arrows on the left of each gel point toward the size of some DNA molecular weight markers.

is the point at which germination stops in common bean (Díaz-Camino et al. 2005). From this point on, the mRNA level decreased slightly but was still clearly detectable after 40 h post-imbibition (Fig. 8B, lane 40 h). Thus, the expression of *PvRACK1* mRNA appears to be induced and differentially regulated during germination of *P. vulgaris*.

A polar auxin transport blocker did not have any effect on the level of *PvRACK1* mRNA accumulation but auxins delayed the point of maximum mRNA accumulation

As the *PvRACK1* mRNA showed a peak of accumulation in the seedlings at early germination times, *PvRACK1* is also the ortholog of *arcA*, and auxins change significantly during germination (Bialek et al. 1992), the level of this mRNA accumulation was also analyzed under the influence of synthetic auxins at various post-imbibition times. Treatments with 25 μ M 2, 4-D (Fig. 9A) and 50 μ M IAA (Fig. 9B) during germination resulted in a delay of the time of maximal peak of expression of the *PvRACK1* transcript, from 32 to 40 h (Fig. 9A, B; lanes 40 h, respectively), compared with the 32 h peak of mRNA accumulation in untreated seedlings (Fig. 8B, lane 32 h). In addition, treatment with the polar auxin transport blocker NPA (25 μ M) had no effect on the increase of *PvRACK1* transcript accumulation levels (Fig. 9C, lanes 0–48 h) and was comparable to the untreated seedlings (Fig. 8B, lanes 0–40 h). The

```

1 AAATGAATCC TATTTGTGTA TATATATATG TGTAGGTATA CATAAATAAT
51 TGATTGGCCA ATATAAATAA AATATCTTAA TGTGCCATGT ATGAGAGGAG
101 ATTGAAAAGT CTAATTAATA TACTGAAACT TTGATTGGGC CTGAAAAGAAG
151 TTTGGGAATG TTGGGCCTAA AAGAAGTTGG GCGTATTGG GCCTGAAAGA
201 AGTTGGGAAT AGTGGGCCTG AAGTAAACTG AAACCGCAAC ACTTGAGGAA
251 AAGAAAAAAA GGATCTGAAA ACCCTAATGA GGTGTGTGT ACCCGCTATA
301 TATTCTTTCG CGAGAGGCCAA AGCGTGGCTT AGAAACACAA AAGCCTCTCA
351 CAGAGTAAGG GAACTCGAAA ACCCTAGTAA TCTCTCATCT CTGTGTTCTT
401 TGTCTTCCTG TTAGAAGCAA AA

```

Fig. 4. Promoter sequence of *PvRACK1*. The promoter 5'-end sequence from nucleotide 1 (nucleotide 1 equivalent to nucleotide 18 on the GenBank reported sequence number FJ959041) to 422, just prior to the ATG translation start, was analyzed for transcriptional and regulatory regions. The found regions of promoter and regulatory sequences are shown labeled and underlined. TATA: the TATA box; ARRIAT element: a response regulator sequence for the ARR1-binding element; -300 element: a -300 regulatory element sequence; *telo* box: a *telo* box and SITEIIATCYTC: several TCP domain protein binding (Site II) element regions.

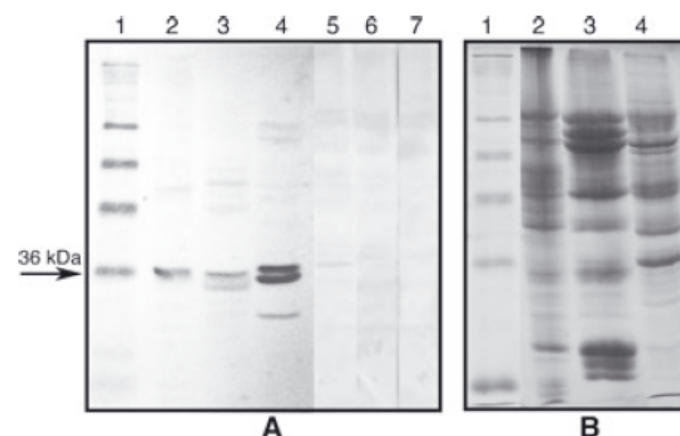


Fig. 5. (A) Western blot of various plant homogenates with anti-PA218 antibodies. The anti-PA218 antibodies showed a strong reaction against the 36 kDa protein band and some degradation products from it in total homogenates from common bean (lane 2), soybean (lane 3) and pea (lane 4). In addition, the antibody immunostaining signal was gradually decreased when molar proportions of decapeptide:anti-PA218 of 1:1 (lane 5), 100:1 (lane 6) and 200:1 (lane 7) were incubated prior to the normal western blotting procedure. Lane 1 shows molecular weight markers of 98, 64, 50, 36, 22 and 16 kDa. (B) An equivalent denaturing 12% polyacrylamide gel stained with Coomassie blue showing the equal amounts of loaded protein (approximately 20 μ g) per lane for lanes 2–4. Equal amounts of protein were also loaded in lanes 5–7.

level of protein was unchanged throughout the post-imbibition times tested in all treatments and identical to what was observed in Fig. 8A. These data indicate that, during *P. vulgaris* germination, the auxin treatment affected the transcript of *PvRACK1* by delaying its maximal peak of accumulation, but NPA did not affect the levels of transcript or protein accumulation significantly.

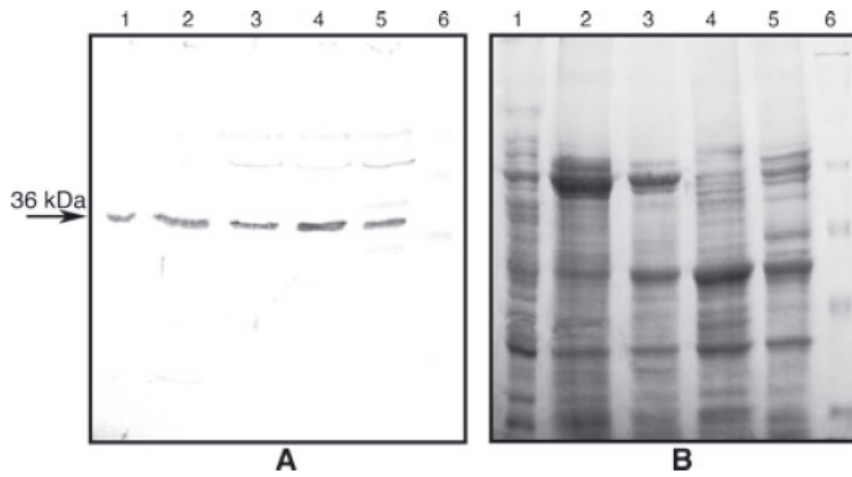


Fig. 6. (A) Western blot of various *Phaseolus vulgaris* tissues detected with anti-PA218 antibodies. The anti-PA218 antibodies showed a strong reaction against the 36 kDa protein in root nodules (lane 1), roots (lane 2), stems (lane 3), leaves (lane 4) and pods (lane 5). Lane 6 shows BioRad prestained molecular weight markers with bands of 250, 42, 30, 22 and 15 kDa seen clearly on the gel. (B) An equivalent denaturing 12% polyacrylamide gel was stained with Coomassie blue to show the equal amounts of loaded protein (approximately 20 µg) per lane.

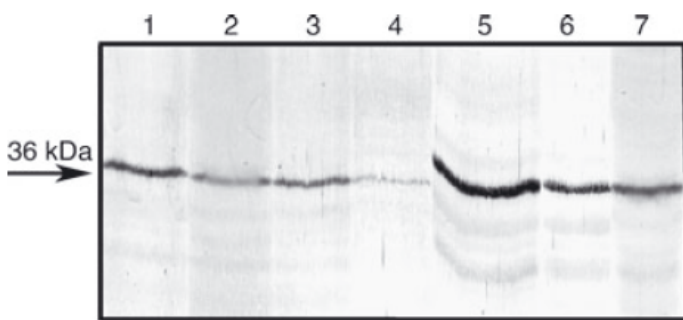


Fig. 7. Distribution of *PvRACK* in differentially extracted microsomes and soluble fractions of embryo axes from *Phaseolus vulgaris* analyzed by western blot with anti-PA218 antibodies. A microsomal fraction was obtained and the insoluble membranes were differentially extracted with various salts and detergents (see Section on Materials and methods). The 36 kDa protein was detected in all fractions: insoluble 100 000 g pellet (lane 1); soluble 100 000 g supernatant (lane 2); 100 000 g supernatant from 0.5 M KCl extraction of insoluble pellet (lane 3); 100 000 g supernatant from 0.5% TX-100 extraction of KCl-extracted pellet (lane 4); 100 000 g supernatant from 0.1 M Na₂CO₃ extraction of KCl/TX-100-extracted pellet (lane 5); 14 000 g supernatant from Laemmli's sample buffer extraction and heating at 95°C of KCl/TX-100/Na₂CO₃-extracted pellet (lane 6) and initial PBS extract (lane 7) from which the microsomal fraction was prepared. The arrow points toward the position of migration of the 36 kDa protein.

Discussion

The 36 kDa protein from *P. vulgaris* is the RACK1 and *arcA* homolog

A 36 kDa protein that we isolated from *P. vulgaris* had its closest identity to a reported G_β-like protein from soybean and therefore, we originally believed that it was more related to a G_β-like subunit. However, amplification of the full cDNA sequence and careful analysis of all related sequences showed that the protein

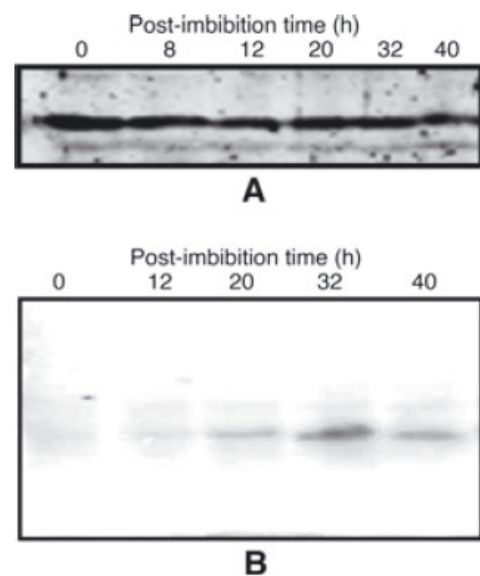


Fig. 8. *PvRACK1* protein and mRNA expression analysis at various post-imbibition times. (A) The embryo axes or hypocotyls of germinating seeds at various post-imbibition times were processed for SDS-PAGE, and the accumulated protein analyzed at various times from 0 to 40 h by western blot with anti-PA218 antibodies (see Section on Materials and methods). The level of protein remained practically unchanged throughout the various time points (lanes 0–40 h). (B) In parallel, the mRNA at equivalent time points was extracted and processed for northern blot and the membrane hybridized with a 500 bp probe from *PvRACK1*. Note the peak of mRNA accumulation at 32 h (B, 32 h).

is more closely related to RACK1 and *arcA* sequences previously annotated in the GenBank. Thus, the 36 kDa protein that we identified and sequenced is the RACK1 ortholog in *P. vulgaris*. The sequence showed two highly conserved aPKC binding sites with the first stretch being 100% identical to RACK1 from human and mouse (Table 3). The protozoan *T. cruzi* even had a 75%

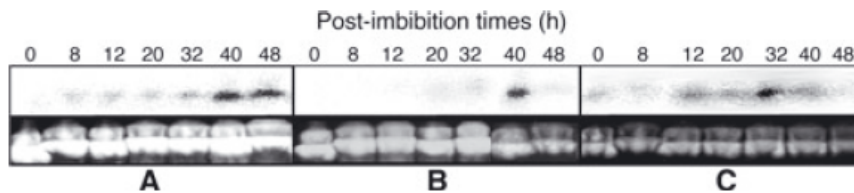


Fig. 9. Northern blots of *Phaseolus vulgaris* at various post-imbibition times in the presence of synthetic auxins and the polar auxin transport blocker NPA. The embryo axes or hypocotyls of germinating seeds in 25 mM 2, 4-D (A), 50 mM IAA (B) or 25 mM NPA (C) were processed for mRNA extraction and northern blot (see Section on Materials and methods). The accumulated mRNA, separated on a gel with equal amounts or RNA loaded, was hybridized at various times from 0 to 40 h with a 500 bp probe from *PvRACK1*. The maximal peak of mRNA accumulation was detected at 40 h in both auxin treatments (40 h in A and B, respectively), whereas in the presence of the polar auxin transport blocker NPA, it remained unchanged at 32 h (32 h in C), as in the untreated seedlings.

identity score for this sequence. The second sequence is not as conserved but it still displays a 75% identity with human and mouse aPKC binding sequences. The relatively high identity with sequences that are designed to bind aPKC in mammals contrasts sharply with the fact that in available plant genomes that have been completely sequenced, the equivalent sequences for PKC do not exist (Chen et al. 2006). Thus, either equivalent kinase-binding partners with highly divergent sequences exist, or the equivalent function for recruiting an activated kinase has been lost and they associate with other types of proteins. It is known that RACK proteins bind to proteins with C2 domains (see below), so their possible association and functional consequences in plants remain to be demonstrated. With respect to other reported similar sequences, a phylogenetic tree showed that the *PvRACK1* sequence (Fig. 2) is most closely related to similar plant sequences. Within this group, distinct sub-groups can be distinctly observed. For example, one is constituted with sequences from the legumes soybean and alfalfa (GLYMA and MEDSA in Fig. 2, respectively). Another one groups with dicots such as *A. thaliana* and *B. napus* (ARATH and BRANA in Fig. 2, respectively). Other sub-group of plant sequences which fall in a more distant but adjacent branch within the same cluster are those from the *Solanaceae* dicots such as *N. tabacum* and *S. tuberosum* (NICTA and SOLTU in Fig. 2, respectively). As the branches of the tree diverge farther apart, the relatedness of the organisms also become more distant. Thus, distinct separations are evident from sequences that group independently together into plants (Fig. 2A), algae (Fig. 2B), amphibia and fish (Fig. 2C), mammals (Fig. 2D), insecta (Fig. 2E), and fungi (Fig. 2F) although the related sequences still share certain clusters of the tree. For example, some unicellular algae and fungi sequences occupy the two most distant but still adjacent branches to the cluster of plant sequences (Fig. 2B, F, respectively). Thus, all these sequences appear to have evolved from a common ancestor, from which they diverged into two major groups of inter-related species,

one enclosing amphibians, fish, insects and mammals, and the other fungi, algae and plants. It is interesting to note that the most distant groups also differ in the availability of an aPKC binding partner (i.e. plants vs mammals).

Putative binding partners for a seven-bladed propeller structure of *PvRACK1*

The sequence of *PvRACK1* also displays seven WD40 repeats, which in molecular models of highly identical proteins such as the *G. max* putative G_{β} -subunit (SWISS MODEL-protein modeling service from UniProt Knowledgebase; protein GLB_SOYBN Q39836) and *Arabidopsis* (RACK1A; Chen et al. 2006) orthologs form the seven-bladed structure of RACK1 (McCahill et al. 2002), typical of β -propeller-type proteins (Ter Haar et al. 2000). Thus, similar binding partners and interaction platforms in different parts of the molecule can be expected. The RACK1 ortholog in yeast has been proposed recently to play a role in ribosomal assembly and protein translation (Nilsson et al. 2004). In parallel, the RACK ortholog in *Arabidopsis* has been found associated with the 40S subunit of ribosomes in this plant (Chang et al. 2005). It is proposed that the RACK molecule would recruit aPKC to the ribosome in order to shuttle a kinase to phosphorylate initiation factor 6 and perhaps, other mRNA associated proteins (Nilsson et al. 2004). RACK has also been reported to associate in a calcium- and phosphatidylserine-dependent manner, to PKC and other proteins such as Src and β -integrin via their C2 domains. Identified plant protein orthologs containing such domains are synaptotagmin, phosphatidylinositol 3-kinase and β -integrins which have all been identified in plants (Clark et al. 2001, Craxton 2000) and could be candidates for protein-protein interaction and signal-transduction function. It has been recently reported that mutations that impair RACK1A function in *Arabidopsis* cause a number of defects in developmental processes such

as seed germination, leaf production and flowering, as well as alterations in auxin-mediated signal-transduction mechanisms (Chen et al. 2006, Guo and Chen 2008). Those data suggest that the binding function of RACK as an adaptor protein for signal-transduction mechanisms in the plant cell is fundamental for growth and auxin-mediated differentiation and development.

RACK1 is present in other plant species, with PvRACK1 displaying a wide distribution in subcellular compartments and tissues, and a small gene family

Custom-made antibodies against a decapeptide derived from the internal PvRACK1 peptide sequence named anti-PA218 antibodies were shown to specifically immunostain a 36 kDa protein corresponding to PvRACK1 in embryo axes extracts (Fig. 5A, lanes 2, 5–7). Besides common bean, the anti-PA218 antibody detected the presence of RACK-related proteins in soybean and pea (Fig. 5A, lanes 3 and 4, respectively), which was a somewhat expected result for soybean because its related sequence shares a high identity with common bean. However, the fact that the antibody is raised against a decapeptide makes high sequence identity crucial for detecting the RACK homolog in any other plant species by immunoblotting. Thus, although the pea sequence is not reported yet, the fact that the anti-PA218 antibody is able to detect the protein implies that the RACK1 ortholog of this species is highly identical to PvRACK1 as well.

In addition to observing the protein in other plant species, we analyzed the tissue distribution of the protein in various common bean vegetative tissues and in differentially extracted fractions from the bean embryo axes because of its proposed roles in cell proliferation and of adaptor protein to target other proteins to different subcellular compartments. We found a ubiquitous distribution of the protein in all vegetative tissues analyzed, but we found a slightly higher amount in leaves using equal protein loads from each tissue in the gel. This was somewhat surprising because the PvRACK1 mRNA was found at lower levels in leaves than in other tissues of the plant (T. Islas-Flores, unpublished observations). These data suggest that the protein may be highly stable and perhaps being transported to this tissue. It remains to be determined how the bean plant may accomplish this transport.

Analysis of the protein distribution in differentially extracted fractions from embryo axes also showed a ubiquitous distribution within the cell. Thus, we did not find a preferential distribution of the protein in membranes but rather, it was found in the cytoplasmic

soluble fraction of the cells from the embryo, as well as in the high salt extract containing the ionically bound proteins. The protein was also found as an intrinsic membrane protein because it was released with detergent from the high salt-extracted pellet. Furthermore, the luminal intrinsic proteins released with carbonate after the detergent extraction also released protein indicating that PvRACK1 was also found in Golgi and highly folded membranes. The most surprising result was that after this last extraction, a well detectable amount of protein was still released by a harsh extraction with Laemmli's denaturing buffer and heat, indicating that a part of the protein was associated with the detergent-resistant cell matrix. The association of PvRACK1 with this matrix may indicate a functional analogy with the scaffolding action of RACK1 with plectin in the cytoskeletal matrix of animal cells where it is associated with detergent-resistant cytoskeletal fractions under normal conditions (Osmanagic-Myers and Wiche 2004). The presence of the protein in all the fractions analyzed is consistent with its proposed multifunctional role of targeting signaling proteins to different cellular compartments (including the ribosome; Nilsson et al. 2004), being its localization to these compartments critical for normal cell function.

The size of the gene family can also give some clues as to the possible existence of isoforms of the protein and ways in which it may be regulated. When we carried out a Southern blot analysis to determine the number of genes, we detected a limited number of bands after restricting the DNA with enzymes that had restriction sites present in the sequence. The hybridization pattern resembles that of the *G. max* ortholog, where also very few bands were observed by Southern blot analysis, and thus, it was also concluded that only one or two genes code for this protein in this species (Nielsen et al. 2001). It is also noteworthy that these two sequences are closest in the phylogenetic tree (Fig. 2). Furthermore, a genomic DNA PCR amplification assay amplified a single band of approximately 975 bp with primers used previously to amplify the whole cDNA sequence for PvRACK1 (Fig. 3B). Thus, it can be concluded that the gene family of PvRACK1 consists of only one or two genes and that at least one of these genes lacks introns. It seems a consistent pattern that some proteins such as *Arabidopsis* profilin have a multigene family in this species (Huang et al. 1996), whereas there are only one-two profilin genes in *P. vulgaris* (Guillén et al. 1999). Thus, it is not so surprising that common bean has only a few PvRACK1 representatives compared with *Arabidopsis* with three members (Chen et al. 2006). In addition, the lack of introns in the *P. vulgaris* gene contrasts sharply with the fact that all three RACK

members of *Arabidopsis* (At3g18130.1, At3g48630.1 and At1g18080.1) have introns of 281, 310 and 592 bp, respectively (TAIR). Taken together, these data are consistent with the recent report in *Arabidopsis* which shows functional substitution among its RACK1 genes (Guo and Chen 2008) and suggests regulation through differential gene expression, while the common bean protein expression might be tightly regulated within the *P. vulgaris* untranslated regions to accommodate for its putative multifunctional purposes. Indeed, the promoter sequence analysis showed several putative regulatory regions (Fig. 4). These regulatory regions included the sequence for the ARR1-binding element (ARR1AT Element, Fig. 4), which is a transcriptional activator found in *Arabidopsis* (Sakai et al. 2000). Another region was similar to a -300 regulatory element sequence. This sequence was reported as an enhancer of endosperm-specific transcription of the seed storage protein glutenin (Thomas and Flavell 1990). Finally, several TCP domain protein binding (Site II) element regions (SITEIIATCYTC element, Fig. 4) were also detected. These elements are implicated in the expression of genes in meristematic tissues and/or proliferating cells and, consistent with our findings, present in more than one copy and accompanied by a *telo* box (*telo* box, Fig. 4; Welchen and Gonzalez 2006). These data further suggest that *PvRACK1* expression is under the control of several regulatory elements that are implicated in several fundamental functions within the plant cells that include transcriptional activation, regulated expression and proliferation.

Expression of the *PvRACK1* protein is maintained constant although its mRNA appears to increase as germination proceeds and the transcript is slightly affected by auxin but unaffected by polar auxin transport blocker treatments

Western blot analysis with anti-PA218 antibodies of common bean embryo axes after the initiation and after various post-imbibition times showed a well detectable amount of the *PvRACK1* protein. As we are interested in the early germination events and germination in common bean ends at 36 h (Díaz-Camino et al. 2005), we carried out our analysis from 0 to 40 h post-imbibition. The level of protein was clearly detectable from the pre-imbibed embryo axes indicating that sufficient protein is stored during the seed filling process to be utilized at the initiation and early germination events. This protein must also be quite stable because it remained at constant levels throughout the time intervals of analysis to up to 40 h, contrary to the mRNA levels, which were undetectable

during the initial post-imbibition times. This suggests that the initial stored protein is important at the onset of germination, and a constant level of expression is required throughout the germination process. This is consistent with the requirement of the protein for signal-transduction processes and regulation of the protein expression per se (Nilsson et al. 2004), since the very start of germination. However, it is intriguing that the mRNA peak of accumulation is detected at 36 h, which is the time when germination ends in *P. vulgaris* and the radicle emerges (Díaz-Camino et al. 2005). This might suggest a *de novo* synthesis of this protein beginning just before the peak of germination, although this remains to be tested.

It was recently reported that stopping auxin transport through impairing the PIN2 efflux carrier that exports auxin from root cells with the chemical D'orenone severely inhibited the polarized growth of root hairs in *Arabidopsis* (Schlicht et al. 2008). Furthermore, since the *PvRACK1* gene of *P. vulgaris* is also an *arcA* homolog (Ishida et al. 1993), auxin changes could profoundly affect its expression. Therefore, we tested the germination process under the presence of the synthetic auxins 2, 4-D and IAA, and the polar auxin transport blocker NPA. Surprisingly, neither the synthetic auxins nor the polar auxin transport blocker had any effect on the *PvRACK1* protein during the post-imbibition process. However, the mRNA accumulation of *PvRACK1* levels during the post-imbibition process showed a slight delay of 8 h in the peak of *PvRACK1* mRNA accumulation when either auxin was present, suggesting that the expression of this gene during early germination in common bean is not severely affected by the level of auxin. These results also suggest that the RACK1-auxin related effects are significantly different in common bean compared with how auxins affect developmental functions in other plants such as *Arabidopsis*. The analysis of loss-of-function *RACK* mutants in these plants showed numerous defects in developmental processes that included seed germination, leaf production and flowering, and these appeared to be related to auxin-mediated signaling because of changes in the sensitivity to auxin treatments (Chen et al. 2006). Although 2, 4-D was not used in their treatments during seed germination, these mutants had a low sensitivity to brassinosteroids and gibberellin, and hypersensitivity to abscisic acid, suggesting that RACK1A from *Arabidopsis* is involved in multiple signal-transduction processes that are also related to auxin (Chen et al. 2006). It is also possible that due to the multifunctionality of RACK1 in common bean and, particularly during early germination events, its role in this species is more restricted to regulation of protein translation in ribosomes (Nilsson et al. 2004).

These results altogether show that *PvRACK1* is the *RACK1* and *arcA* ortholog in the genome of *P. vulgaris* and that it contains all the expected features (such as a seven-bladed propeller structure) of a protein with a platform for binding and interacting with other partners for multifunction purposes within the cell. Of special interest is the fact that it has two highly conserved aPKC binding sequences despite the fact that no PKC orthologs have been found in plants so far. Its small gene family and several regulatory element sequences in *P. vulgaris* suggest a tight regulation but its expression does not appear to be severely affected by auxins during early germination in the seedling. We are currently testing the effect of turning off its expression by taking advantage of the fact that there may be only one-two genes in the *P. vulgaris* genome. We are also in the search for interactive partners because finding its binding proteins will allow us to gain more insight into the various functions that *PvRACK1* is proposed to serve in the plant.

Acknowledgements – This work was partially supported by a grant number 32650-B from the National Council of Science and Technology of México (CONACyT) and special Graduate Program Support Grant from CONACyT to T. Islas-Flores. A joint grant from the National Science Foundation and CONACyT to Drs E. L. B. and M. A. V. is also acknowledged. We thank the sequencing facility of the Institute of Biotechnology of UNAM for sequencing of the DNA and some oligonucleotide synthesis. We thank Arturo Ocadiz and Juan Manuel Hurtado from the Informatics Facility at the Institute of Biotechnology-UNAM for technical help.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402
- Bialek K, Michalczyk L, Cohen JD (1992) Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* 100: 509–517
- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 22: 248–254
- Chang I-F, Szick-Miranda K, Pan S, Bailey-Serres J (2005) Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of *Arabidopsis* cytosolic ribosomes. *Plant Physiol* 137: 848–862
- Chen S, Spiegelberg BD, Lin F, Dell EJ, Hamm HE (2004) Scaffolding and docking proteins in the heart. *Interaction of Gbc with RACK1 and other WD40 repeat proteins*. *J Mol Cell Cardiol* 37: 399–406
- Chen J, Ullah H, Temple B, Liang J, Guo J, Alonso JM, Ecker JR, Jones AM (2006) RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 57: 2697–2708
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156
- Clark GB, Thompson G Jr, Roux SJ (2001) Signal transduction mechanisms in plants: an overview. *Curr Sci* 80: 170–177
- Craxton M (2000) Genomic analysis of synaptotagmin genes. *Genomics* 77: 43–49
- Dalrymple MA, Petersen Bjorn S, Friesen JD, Beggs JD (1989) The product of the *PRP4* gene of *S. cerevisiae* shows homology to β subunits of G proteins. *Cell* 58: 811–812
- Díaz-Camino C, Conde R, Ovsenek N, Villanueva MA (2005) Actin expression is induced and three isoforms are differentially expressed during germination in *Zea mays*. *J Exp Bot* 56: 557–565
- Guillén G, Valdés-López V, Noguez R, Olivares J, Rodríguez-Zapata LC, Pérez H, Vidali L, Villanueva MA, Sánchez F (1999) Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues. *Plant J* 19: 497–508
- Guo J, Chen J-G (2008) *RACK1* genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 8: 108
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27: 297–300
- Huang S, McDowell JM, Weise MJ, Meagher RB (1996) The *Arabidopsis* profilin gene family (Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes). *Plant Physiol* 111: 115–126
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23: 254–267
- Ishida S, Takahashi Y, Nagata T (1993) Isolation of a cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein β -subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11152–11156
- Kiyosue T, Ryan CA (1999) Molecular cloning of two cDNAs encoding G protein beta subunit-like proteins from tomato (Accession Nos. AB022686 and AB022687). *Plant Gene Register (PGR99-045)*. *Plant Physiol* 119: 1567–1568
- Kost B, Mathur J, Chua NH (1999) Cytoskeleton in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 2: 462–470

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685
- Lim A, Zhang L (1999) WebPHYLP: a web interface to PHYLIP. *Bioinformatics* 15: 1068–1069
- Mallet L, Bussereau F, Jacquet M (1994) Nucleotide sequence analysis of an 11.7 kb fragment of yeast chromosome II including BEM1, a new gene of the WD-40 repeat family and a new member of the KRE2/MNT1 family. *Yeast* 10: 819–831
- McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ (2002) The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol* 62: 1261–1273
- McKhann HI, Frugier F, Petrovics G, Coba de la Peña T, Jurkevitch E, Brown S, Kondorosi E, Kondorosi A, Crespi M (1997) Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): a role in hormone-mediated cell division? *Plant Mol Biol* 34: 771–780
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321–4326
- Nielsen NC, Beilinson V, Bassüner R, Reverdatto S (2001) A G β -like protein from soybean. *Physiol Plant* 111: 75–82
- Nilsson J, Sengupta J, Frank J, Nissen P (2004) Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 5: 1137–1141
- Osmanagic-Myers S, Wiche G (2004) Plectin-RACK1 (receptor for activated C kinase 1) scaffolding. *J Biol Chem* 279: 18701–18710
- Pawson T, Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278: 2075–2080
- Sakai H, Aoyama T, Oka A (2000) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* 24: 703–711
- Schlicht M, Samajová O, Schachtschabel D, Mancuso S, Menzel D, Boland W, Baluška F (2008) D'orenone blocks polarized tip growth of root hairs by interfering with the PIN2-mediated auxin transport network in the root apex. *Plant J* 55: 709–717
- Ter Haar E, Harrison SC, Kirchhausen T (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the β -propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1096–1100
- Thomas MS, Flavell RB (1990) Identification of an enhancer element for the endosperm-specific expression of high molecular weight glutenin. *Plant Cell* 2: 1171–1180
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882
- Towbin J, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350–4354
- Ullah H, Chen J, Temple B, Boyes DC, Alonso JM, Davis KR, Eckerd JR, Jones AM (2003) The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell* 15: 393–409
- Welchen E, Gonzalez DH (2006) Overrepresentation of elements recognized by TCP-domain transcription factors in the upstream regions of nuclear genes encoding components of the mitochondrial oxidative phosphorylation machinery. *Plant Physiol* 141: 540–545

ANEXO 2

Publicación en Molecular Plant Microbe Interaction

Islas-Flores T, Guillen G, Alvarado-Affantranger XD, Lara M, Sanchez F, Villanueva MA (2011). *PvRACK1* loss-of-function impairs cell expansion and morphogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* [Epub ahead of print]

*Pv*RACK1 loss-of-function impairs cell expansion and morphogenesis in
Phaseolus vulgaris L. root nodules.

Tania Islas-Flores¹, Gabriel Guillén¹, Xóchitl Alvarado-Affantranger¹, Miguel Lara-Flores², Federico Sánchez¹ and Marco A. Villanueva^{3,¶}

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México, U.N.A.M.
Apartado Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos 62250, México.

²Departamento de Genómica Funcional de Eucariotes
Centro de Ciencias Genómicas
Universidad Nacional Autónoma de México, U. N. A. M.
Apartado Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos 62210, México.

³Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales
Universidad Nacional Autónoma de México, U. N. A. M.
Prolongación Avenida Niños Héroses S/N
Puerto Morelos, Quintana Roo 77580, México.
Telephones: +52 (998) 871 0219, +52 (998) 871 0009 ext. 177
Fax: +52 (998) 871 0138

¶Author for correspondence

E-mail: marco@cmarl.unam.mx

ABSTRACT

RACK1 (Receptor for Activated C Kinase) is a highly-conserved, eukaryotic protein of the WD-40 repeat family. Its peculiar β -propeller structure allows its interaction with multiple proteins in various plant signal-transduction pathways, including those arising from hormone responses, development, and environmental stress (Ullah et al., Protein Sci. 17:1-10, 2008). During *Phaseolus vulgaris* root development, RACK1 (*PvRACK1*) mRNA expression was induced by auxins, abscisic acid, cytokinin, and gibberellic acid. In addition, during *P. vulgaris* nodule development, *PvRACK1* mRNA was highly accumulated at 12-15 days post-inoculation suggesting an important role after nodule meristem initiation and *Rhizobium* nodule infection. *PvRACK1* transcript accumulation was down-regulated by a specific RNA interference construct which was expressed in transgenic roots of composite plants of *P. vulgaris* inoculated with *Rhizobium tropici*. *PvRACK1* down-regulated transcript levels were monitored by qRT-PCR analysis in individual transgenic roots and nodules. We observed a clear phenotype in *PvRACK1*-knockdown nodules, in which nodule number and nodule cell expansion were impaired resulting in altered nodule size. Microscopic analysis indicated that, in *PvRACK1*-knockdown nodules, infected and uninfected cells were considerably smaller (80% and 60%, respectively), than in control nodules. In addition, non-infected cells and symbiosomes in silenced nodules showed significant defects in membrane structure under electron microscopy analysis. These findings indicate that *PvRACK1* has a pivotal role in cell expansion and in symbiosome and bacteroid integrity during nodule development.

INTRODUCTION:

Eukaryotic cells have the ability to integrate signals using adaptor proteins that allow the formation of multi-protein complexes with signaling components in proximity. These adapter proteins play key roles in the multiple signal-transduction processes that normally occur within a cell. The so-called β -propeller structure is a molecular platform capable of integrating several signals since many proteins can display the structure even though they play diverse biological functions and, at the same time, multiple proteins can interact with such structure. RACK1, which is a highly conserved scaffold protein found ubiquitously expressed in both animals and plants, is a member of this family of proteins and contains seven WD-40 repeats that form its β -propeller structure. Although it was originally identified as an anchoring protein for activated protein kinase C (PKC) in mammals (Ron et al., 1994), it is now recognized as a versatile scaffold protein that can bind several signaling molecules from diverse cellular pathways (McCahill et al., 2002). In mammalian cells, RACK1 participates in diverse biological processes such as cell growth (McCahill et al., 2002), assembly of the 80S ribosome from 40S and 60S subunits (Ceci et al., 2003), and neuropathology, cellular stress, protein translation and developmental processes (Ullah et al., 2008) among others. In addition, RACK1 is over-regulated during angiogenesis and in human carcinoma, and can contribute to growth and tumor spreading (Berns et al., 2000).

Plant RACK1 was first identified as the product of *arca* (*Auxin Regulated Gene from Cultured Cells*), isolated from a differentially expressed library to screen

auxin-responsive genes in tobacco BY2 cells (Ishida et al., 1993). Up to date, cDNA homologous sequences have been identified in a number of plants including soybean (*G_β-like*, *G protein β like*; Nielsen et al., 2001); alfalfa (*Msgb1*, *Medicago sativa G_β-like*; McKhann et al., 1997), *Arabidopsis thaliana* (*AtarcA*), rice (*RWD*, *rice protein containing the WD-40 repeat*; Iwasaki et al., 1995, Nakashima et al., 2008), tomato (*LeArcA*; Kiyosue and Ryan, 1999), *Brassica napus* (*BGB1*, *Brassica G protein Beta subunit 1*; Kwak et al., 1997), and common bean (*PvRACK1*; Islas-Flores et al., 2009). Recently, it was reported that in the rice genome, two RACK1 genes (*RACK1A* and *RACK1B*) are encoded, and that one of them, *RACK1A*, is positively regulated by Rac1, auxin, abscisic acid, and jasmonate (Nakashima et al., 2008). When *O. sativa* *RACK1A* expression was silenced by RNAi, the regeneration of viable plants from rice callus, the production of H₂O₂, and expression of the pathogen defense gene *PBZ1*, greatly decreased. Thus, *O. sativa* *RACK1A* also appears to play an important role in ROS production and defense gene expression in rice cell cultures (Nakashima et al., 2008). In legume roots, this protein has been implicated in hormone-mediated signal transduction; for example, the *M. sativa* *Msgb1* (*RACK1A* homologous gene) was induced when alfalfa roots were treated with cytokinin. In addition, a high level of accumulation was observed in nodule meristem after *S. meliloti* inoculation (McKhann et al., 1997). During nodule formation in plants, there is active cell growth and proliferation in a highly proliferating and regulated process. This could be regarded as similar to processes occurring during, growth and proliferation in mammalian cells, where RACK1 is involved. Therefore, the nodulation process is a provoking model for studying RACK1 function in plants. Prior to this

nodulation process, a specific recognition of the bacteria by the plant and a molecular dialogue between Nod factors from Rhizobiaceae bacteria and the plant root receptors must occur. Several signaling molecules involved in Nod factor perception have been identified, including receptor-like kinases (reviewed in Gough, 2003). In addition, the Nod factor signaling events are most likely transduced by a signaling cascade implicating adaptor proteins and second messengers. Considering that: a) the nitrogen-fixing root-nodule is a plant organ where an intense program of cell proliferation and expansion occurs (Crespi and Frugier, 2008); b) *PvRACK1* has similar biochemical features to other RACK1 proteins (36 kDa protein, seven WD-40 repeats, conserved PKC binding domains); and c) *PvRACK1* is very likely encoded by a single gene in the common bean genome (Islas-Flores et al., 2009); we searched for the possible involvement of *PvRACK1* in root nodule development by RNA interference (RNAi). We report here that *PvRACK1*-knockdown common bean nodules have a strong nodulation phenotype in which nodule cell expansion and symbiosome and bacteroid integrity are severely affected.

RESULTS

PvRACK1 is differentially expressed during nodulation.

RACK1 is a protein that participates in diverse plant developmental processes (Guo and Chen, 2008). Therefore, despite its ubiquitous expression, changes in expression can be expected in different cellular types and physiological stages.

In order to confirm our prediction that *PvRACK1* could participate in proliferation processes associated with *P. vulgaris* nodules, we quantified mRNA levels of *PvRACK1* during nodule development. mRNA levels increased slowly after inoculation with *R. tropici* (Fig. 1A, R5-N18) and reached a peak of highest accumulation at 12-15 dpi (Fig. 1A, N12-N15). These time points correspond, in particular, to those developmental stages in which determinate nodule meristem cells cease to divide (nodule meristem exhausts) and cells continue to grow by cell expansion. Therefore, these results indicate that *PvRACK1* is mostly accumulated at the onset of intracellular rhizobia infection and nodule cell expansion.

PvRACK1 expression is induced by IAA, ABA, cytokinin, and gibberellin

Plant RACK1 homologs have been shown to be involved in hormonal responses (Ishida et al., 1993; Iwasaki et al., 1995; McKhann et al., 1997; Kwak et al., 1997; Chen et al., 2006; Nakashima et al., 2008; Guo et al., 2009). We reported previously that *PvRACK1* expression is not severely affected by IAA in early germination (Islas-Flores et al., 2009); however, nothing was known about the effect of other hormones on *PvRACK1* expression in other tissues. Therefore, we tested the effect of auxin (25 μ M IAA), abscisic acid (10 μ M ABA), cytokinin (25 μ M kinetin) and gibberellin (10 μ M GA₄) on *PvRACK1*

expression in roots after 1, 3, 6 and 9 days of treatment (Fig. 1B). All these hormones resulted in the induction of *PvRACK1* expression from the first day of treatment, and in a clear decrease after 3-9 days of treatment for ABA, IAA and GA. Only with the cytokinin treatment, the induced expression level remained relatively constant (Fig. 1B). These findings indicate that *PvRACK1* expression is also modulated by hormonal levels during root development in *P. vulgaris*.

PvRACK1 silencing phenotype

The scaffold function of RACK1 suggests a role in multiple signal transduction and hormonal signaling processes in a regulated fashion. Thus, to maintain the cellular balance, its regulation must be finely controlled. To analyze *PvRACK1* function in *P. vulgaris* nodulation, and with several lines of evidence suggesting that it is most likely represented by a single gene in the *P. vulgaris* genome (Islas-Flores et al., 2009), a specific *PvRACK1*-RNAi construction was made and transformed into composite common bean plants to knock down *PvRACK1* expression. After *PvRACK1* silencing (about 90%; Fig. 2D), the transgenic silenced roots of composite plants showed a similar phenotype (Fig. 2C) compared to control roots (Figs. 2A and 2B). However, the nodules of transgenic composite plants were observed to be smaller in size, with a whitish color, and, moreover, reduced in number (Figs. 2C and 2D), with respect to control plants (Figs. 2A, 2B and 2D). In order to make sure that the *PvRACK1* mRNA expression was inhibited, the transcript level was quantified by real time RT-PCR in individual roots (Fig. 2D, solid bars), and nodules (Fig. 2D, empty bars) from control and *PvRACK1*-knockdown composite plants (Fig. 2D: K599, EMPTY, 1RNAi, 2RNAi and 4RNA). The silencing level obtained was up to

about 90%, and the results indicate that the phenotype is due to this low level of *PvRACK1* mRNA expression. The developmental stage of the *PvRACK1*-knockdown nodules indicates a defect in nodule growth, and is reminiscent of the developmental stage of a nodule in which growth by cell expansion has not yet occurred. At this developmental stage, *PvRACK1* mRNA accumulation levels in a normal nodule correspond to those observed from 5 to 18 days post-inoculation (Fig. 1, R5-N18). These results clearly demonstrate that *PvRACK1*-knockdown severely affects the nodulation process by altering its morphology and number.

PvRACK1 silencing results in small whitish nodules with reduced cell sizes. Silencing of *PvRACK1* expression affects the nodule size (Fig. 2C), but to obtain more detailed information about this phenotype in terms of cell structure and morphology, a microscopic analysis of the silenced nodules was carried out. A microscopic analysis from control and *PvRACK1*-knockdown nodules showed a similar number and distribution of infected and uninfected cells in silenced nodules (Fig. 3C-D and inset in C), with respect to control (Fig. 3A-B and inset in A). However, it was immediately obvious that the cell size of the nodule central zone was reduced, and the cortex was enlarged and greatly disorganized in the *PvRACK1*-knockdown nodules (Figs. 3C-D), compared to control nodules (Figs. 3A-B). The cell size was scored in various samples and sections, and a bar graph was made to show the differences in dimension of both, infected and uninfected cells from *PvRACK1*-knockdown and control nodules (Fig. 4). The larger differences were found between infected cells from *PvRACK1*-knockdown nodules (Fig. 4, RNAi, empty bars), compared to those of

K599 control nodules (Fig. 4, K599, empty bars). Differences in size were statistically significant for both, infected and uninfected cells, thus suggesting that the reduction in cell size arose from the silencing of *PvRACK1* expression.

Electron microscopy of *PvRACK1*-knockdown nodules

To obtain more information about the effect of *PvRACK1* silencing at the subcellular level, an ultra-structural analysis by electron microscopy of *PvRACK1*-knockdown and control nodules was made. Electron micrographs showed evident distinctive features in the *PvRACK1*-knockdown infected cells. Control infected and uninfected cells were regular in size and structure (Fig. 5A-D) with abundant and normal bacteroids (B in Figs. 5A, 5C, and 5D) enclosed by intact-looking symbiosomes (Fig. 5C), with a complete and delimited peribacteroidal membrane (PBM in Fig. 5C, arrows). In addition, the bacteroids had numerous polyhydroxybutyrate granules (PHB in Fig. 5D). However, the most evident difference in the infected cells of *PvRACK1*-knockdown nodules (Fig. 5E-5H), was the abnormal structure of the bacteroids with almost no polyhydroxybutyrate granules (B in Figs. 5G and 5H), with many of these bacteroids collapsed (Fig. 5G), or in the process of disintegration (Fig. 5H). Interestingly, bacteroid size was similar in knockdown and control nodules (Fig. 5G-H compared to Fig. 5C-D). In addition, the cytoplasmic and symbiosomal matrix of control nodules showed an electron dense material that formed a regularly organized network pervading them (Fig. 5D). In contrast, *PvRACK1*-knockdown infected cells were disorganized and denser (Fig. 5E-H), and this electron-dense matrix was severely disorganized (Fig. 5H). These findings indicate that *PvRACK1*-knockdown also has a profound negative effect on the

symbiosome and bacteroid organization and integrity, as well as the cytoplasmic matrix.

DISCUSSION

RACK1 is a versatile protein involved in several cellular processes. The seven blade β -propeller structure renders the *PvRACK1* protein capable to interacting simultaneously with several signaling molecules in a regulated fashion. Plant RACK1 homologs have shown to play an important role in hormone signaling, development and innate immunity (Chen et al., 2006; Nakashima et al., 2008), however, RACK1 function in plants is not yet fully understood.

Nodule and tumor growth resemble each other in terms of angiogenesis formation and the requirement of active proliferation. Indeed, mammalian RACK1 has been shown to be important for the maintenance of tumor angiogenesis and tumor growth. It is up-regulated in different angiogenically active tissues, both *in vitro* and *in vivo*. In addition, it is expressed in tumor angiogenesis (Berns et al., 2000), and over-expressed in colon cancer cells (Saito et al., 2002). RACK1 also promotes breast carcinoma proliferation and invasion/metastasis *in vitro* and *in vivo*, and knockdown of RACK1 in breast carcinoma and in LNCap cells inhibit cell proliferation and tumor growth (Cao et al., 2009, Kraus et al., 2006). Consistent with our hypothesis of *PvRACK1* participating in cell proliferation-related processes, we found that *PvRACK1* mRNA was differentially expressed during nodulation. The increased accumulation of *PvRACK1* mRNA in nodules corresponding to 12-15 dpi (Fig. 1A, N12-N15) showed a potential involvement of this protein in nodule growth. Furthermore, we observed that down-regulation of *PvRACK1* by RNAi in

transgenic roots of composite plants produced a striking phenotype in which nodule number was decreased to 50-76% less nodules than control, and growth was reduced. This phenotype is consistent with that reported for *A. thaliana* *RACK1A* loss-of-function, which showed developmental defects in seedlings and mature plants (shorter hypocotyls and reduced rate of rosette leaf production; Chen et al., 2006), although a microscopic assessment of cellular structures was not carried out in that study. During nodule ontogeny, hormones play important roles regulating nodule morphogenesis and development. Auxin, ABA, cytokinin and GA can be isolated from nodules, where they are in higher concentrations than in uninfected roots (Hirsch and Fang, 1994), indicating a pivotal role regulating nodule morphogenesis and function. Auxins, cytokinin and GA, are positive regulators of nodulation. Signaling by these hormones was affected by the expression of *RACK1* in *Arabidopsis* (Chen et al., 2006). The knockout *rack1a* mutant of *A. thaliana* showed altered sensitivities to hormones; that is, less sensitivity to GA and BR and more responsive to ABA, in seed germination and early seedling development, and less responsive to auxin leading to reduced root size (Chen et al., 2006). These data are consistent with the previously reported roles of *RACK1* in hormonal signal transduction (Ishida et al., 1993, Iwasaki et al., 1995; McKhann et al., 1997 and Kwak et al., 1997). For example, in *M. sativa*, the *Msgb1* gene (*RACK1* homolog) was induced when alfalfa roots were treated with cytokinin. In addition, a high level of accumulation was observed in nodule meristem after *S. meliloti* inoculation (McKhann et al., 1997), suggesting an important role of *Msgb1* in nodulation of this plant. In this work, we also found that *PvRACK1* expression is modulated by the presence of the hormones IAA, ABA, cytokinin, and gibberellins during

root development (Fig. 1B). This, in turn, most likely reflects the multiple levels of regulation and mutual interaction of hormones and *PvRACK1* expression during nodulation, which is highly consistent with the *PvRACK1*-knockdown phenotype. The reduced cell size arising from *PvRACK1*-knockdown nodules, suggests an effect in cell expansion that might be a result of the impairment of hormone-mediated signaling. (Oldroyd and Downie, 2008; Ding and Oldroyd, 2009). Thus, one might speculate that the involvement of plant RACK1 homologs in hormone signaling might be one of the keys to the silencing phenotype in *P. vulgaris* nodulation (less nodule production and smaller nodules (Fig. 2 C). In the knockout, the lack of *PvRACK1* expression might produce less sensitivity to GA and BR that are positive regulators of nodule morphogenesis (Ding and Oldroyd, 2009), and to ABA, which is a negative regulator and is, at the same time, negatively regulated by RACK1A and RACK1C as found in *Arabidopsis* (Guo et al., 2009). In addition, the appearance of a small number of nodules could indicate an effect of *PvRACK1* in an early nodulation stage such as infection; this idea is supported by the fact that we have also observed an increase in *PvRACK1* mRNA by qRT-PCR after the first two hours post-inoculation (data not shown). Although we cannot conclude that the effect of *PvRACK1* knockdown is nodule-specific, the fact that the *PvRACK1* knockdown roots do not seem to be affected, suggests that there are different levels of regulation in cell expansion of these organs. Another pathway that could be possibly affected by *PvRACK1* silencing is membrane synthesis, trafficking and recycling, which is important for growth by cell expansion. In a recent report, *srab1* and *vrab7* silencing in soybean resulted in smaller nodules, and when *srab1* was silenced, fewer nodules were formed (Cheon et al., 1993). Plant

Rab1p and Rab7p are small GTP-binding proteins involved in the biogenesis of the peribacteroid membrane (PBM) (Cheon et al., 1993), so an effect on these proteins could severely affect membrane dynamics and, consequently, nodule size. These results are also consistent with the phenotype provoked by *PvRACK1* silencing on common bean. Thus, another possibility is that *PvRACK1* is also important for membrane dynamics and its silencing may result in an additive effect of both, interference on membrane trafficking, and hormone-mediated signaling, on nodule development and integrity. Vesicular traffic is necessary during membrane synthesis for cell expansion. Therefore, its de-regulation would severely affect such membrane synthesis at key sites. This would, in turn, produce phenotypes with altered and/or defective membranes, which will result in a smaller size of both, infected and uninfected cells (like those shown in Fig. 3 and 4), and abnormal PBM in symbiosomes (like those shown in Fig. 5G-H), and in the symbiosome cytoplasmic matrix surrounding the bacteroids. The involvement of mammalian RACK1 in these vesicular traffic and endosome recycling processes could occur at the level of interaction with one of its binding partners, PI3K. For example, it has been reported that PI3K has a fundamental role in Rab11 localization during mitosis in *C. elegans* (Chen et al., 2008; McCahill et al., 2002; Ai et al., 2009). Alternatively, based on the deteriorated appearance of the knockdown nodules, an additional effect of *PvRACK1* silencing could be the induction of early senescence of the nodule. A key to clarifying the level of these interactions will come from studies on RACK1 ligands in plants. Up to date, there is no information whatsoever about RACK1 binding partners in this kingdom.

The data obtained here indicates that *PvRACK1* plays a pivotal role in nodule growth and maintenance since deteriorated infected cells and bacteroids of *PvRACK1*-knockdown nodules (Fig. 5E-H) are also indicative of an impaired nodule function. The phenotype at the ultrastructural level is also similar to that of *L. japonicus ign1* mutant. IGN1 belongs to an ankyrin repeat protein family, in which symbiosomes are enlarged relative to their bacteroid number (Kumagai et al., 2007).

RACK1 is known to be a versatile protein with many binding partners, which make it prone to be involved in many cellular functions. This fact suggests that it is tightly regulated and its involvement in a single specific function is very difficult to assign. For this reason, various cellular functions are probably affected when its expression is perturbed. Regardless of the specific *PvRACK1* functions that lead to a normal nodule development in common bean, in this work we have clearly demonstrated that it is indispensable for symbiosome integrity, bacteroid development and nodule expansion in infected and uninfected cells, in this species.

MATERIALS AND METHODS

Plant and Cell Lines

Phaseolus vulgaris L. “Negro Jamapa” seeds were used. Seeds were surface-sterilized with chloride gas in a fume hood for 16 h before germination. *Agrobacterium rhizogenes* K599 was used for root transformation, and *R. tropici* CIAT899 were used to induce the nodulation.

Hormone treatment

Surface-sterilized seeds of *Phaseolus vulgaris* L. “Negro Jamapa” were germinated in wet, sterile towels for 4 days; then, seedlings were transferred to a hydroponic medium with B&D solution supplemented with nitrogen (Estrada-Navarrete et al., 2007) at 26-28 °C during 3 days. After this period, hormones were added (25 µM indole-acetic acid [IAA], 10 µM abscisic acid [ABA], 25 µM kinetin and 10 µM gibberellic acid [GA4]). Roots were collected at 1, 3, 6 and 9 days after application of the hormone treatment, and stored at -70 °C. Total RNA was extracted with the hot phenol method with some modifications (Pawlowski, et al., 1994), and RNA concentration was determined with a NANODROP 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.).

PvRACK1 silencing constructs

Total RNA was isolated from 15 dpi nodules by the Chomczynski and Sacchi (1987) method, with some modifications. The *PvRACK1* cDNA sequence for RNAi was amplified with the primers 5'-CACCATGGCGGAAGGACTCGTCCTGAAGG-3' (forward) and 5'-

TACGGTCCCAAGATGCA-3' (reverse). cDNA fragments of 520 bp's were cloned into the pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), sequenced, and the resulting plasmids were recombined with the destiny vector pTDT-DC-RNAi (Valdés-López et al., 2008). The pTDT-*PvRACK1*-RNAi construct was generated.

Agrobacterium rhizogenes induction of *Phaseolus vulgaris* composite plants

Surface-sterilized seeds of *Phaseolus vulgaris* L. "Negro Jamapa" were germinated in wet sterile towels for 3 days; then, seedlings were inoculated with *A. rhizogenes* K599 either alone, or carrying the silencing construction pTDT-*PvRACK1*-RNAi in the upper side of the root. They were then transferred to a hydroponic chamber with B&D-supplemented solution (Estrada-Navarrete et al., 2007) without nitrogen and appropriated aeration at 26-28 °C. After 3 days, *R. tropici* CIAT899 was added to the solution and 26 days after, nodulated hairy roots were analyzed by microscopy. Nodules were collected and processed for microscopic analysis, or frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

Real Time PCR and RT-PCR quantification analyses

For the quantitative analysis of the *PvRACK1* transcript level, total RNA was extracted from silenced and control roots and nodules, and hormone-treated roots. The RNA was treated with DNaseI (Invitrogen), and the concentration was determined by absorbance at 260 and 280 nm in a NANODROP 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific). For transgenic roots and nodules, and the nodulation kinetics, RNA (100 ng) was then mixed with the iScript™ One-

Step RT-PCR kit with SYBR[®] Green (BIO-RAD, Hercules, CA, U.S.A.). For the hormone treated roots, cDNA was synthesized with the RevertAid[™] H Minus First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas Life Sciences, Waltham MA, USA), and 50 ng of cDNA were mixed with Maxima[™] SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences). Each of the *PvRACK1* primers 5'-CTGCACTCCAGTTCAAACCTCG-3' (forward) and 5'-GAGCAGAGCATCAAGATCTGG-3' (reverse); and Elongation Factor 1 (EF1), 5'-GGTCATTGGTCATGTCGACTCTGG-3' (forward) and 5'-GCACCCAGGCATACTTGAATGACC-3' (reverse), as the control housekeeping gene, were added to each reaction at a final concentration of 10 µM. EF1 primer design was based on the reported Bean EST sequence with the GenBank accession number CV530481. Quantitative Real Time RT-PCR was done in triplicate reactions on a qPCR-iQ5, or a CFX96[™] Real Time System C1000[™] Thermal Cycler (BIO-RAD).

Nodulation kinetics and tissue collection

Three days-old seedlings were root-inoculated with *R. tropici* CIAT899 and non-inoculated roots or roots from 5 and 7 days post-inoculation, and nodules from 9, 12, 15, and 18 days post-inoculation, were collected and frozen until ready for RNA analysis.

Microscopy

PvRACK1-knockdown and standard 26 dpi *Phaseolus vulgaris* roots and nodules, infected with *Rhizobium tropici* CIAT899 were collected, fixed, embedded, polymerized with methacrylate, sectioned, and rehydrated as

previously reported (Estrada-Navarrete et al., 2006). After rehydration, root and nodule sections were mounted on a slide and a coverslip for observation under a Zeiss Axiovert 200 M microscope. Images were processed using Adobe Photoshop 7.0 software (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, U.S.A.).

Electron Microscopy

Nodule samples were cut in 1-2 mm sections, fixed, dehydrated (30-100% ethanol series), and pre-embedded in propylene oxide/epoxy resin mixtures (2:1,1:1 and 1:2) (London Resin Company Limited, London, England) for several hours before embedding in 100% epoxy resin for 3 h. Nodules pieces in gelatin capsules (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, U.S.A.) were embedded in epoxy resin. Ultra-thin sections (70 nm) were obtained with an UCT-R ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany) and mounted on nickel grids. They were then stained with 2% aqueous uranyl acetate and visualized under a Zeiss EM900 transmission electron microscope at 80 kV. Micrographs were taken with a digital CCD DualVision 300W camera (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, U.S.A.).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Guadalupe Zavala from the Electron Microscopy facility of the Institute of Biotechnology-UNAM, for her expert technical help. We are also indebted to the Oligonucleotide Synthesis facility of the Institute of Biotechnology-UNAM for the synthesis of specific primers. Tania Islas-Flores was supported by a PhD scholarship (176434) from CONACyT.

LITERATURE CITED

1. **Ai E, Poole DS, Skop AR** (2009). RACK-1 Directs Dynactin-dependent RAB-11 Endosomal Recycling during Mitosis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* **20**:1629-1638
2. **Berns H, Humar R, Hengerer B, Kiefer F, Bategay E** (2000). RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas. *The FASEB J.* **14**:2549-2558
3. **Cao XX, Xu JD, Xu JW, Liu XL, Cheng YY, Li QQ, Xu ZD, Liu XP** (2009). RACK1 promotes breast carcinoma proliferation and invasion/metastasis in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* **123**:375-386
4. **Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhauser N, Marchisio PC, Biffo S** (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* **426**:579-584
5. **Chen JG, Ullah H, Temple B, Liang J, Guo J, Alonso J, Ecker J, Jones A** (2006). RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **57**:2697-2708
6. **Chen S, Lin F, Shin ME, Wang F, Shen L, Hamm HE** (2008). RACK1 Regulates Directional Cell Migration by Acting on $G\beta\gamma$ at the Interface with Its Effectors $PLC\beta$ and $PI3K\gamma$. *Molecular Biology of the Cell* **19**:3909-3922
7. **Cheon CL, Lee NG, Siddique AB, Bal AK, Verma DP** (1993). Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *EMBO J.* **12**:4125-4135
8. **Chomczynski P, Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159

9. **Crespi M, Frugier F** (2008). De Novo Organ Formation from Differentiated Cells: Root Nodule Organogenesis. *Sci. Signal.* **1**, re11
10. **Ding Y, Oldroyd GED** (2009). Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signaling & Behavior* **4**:89-93
11. **Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares J-E, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sánchez F** (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* **2**:1819-1824
12. **Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares J-E, Díaz-Camino C, Santana O, Murillo E, Guillén G, Sánchez-Guevara N, Acosta J, Quinto C, Li D, Gresshoff PM, Sánchez F** (2006). *Agrobacterium rhizogenes* Transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics". *Molec. Plant Microbe Interactions*, **19**: 1385-1393
13. **Gough C** (2003). Rhizobium Symbiosis: Insight into Nod Dispatch Factor Receptors. *Current Biology* **13**:R973-R975
14. **Guo J, Chen J-G** (2008). *RACK1* genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* doi:10.1186/1471-2229-8-108
15. **Guo J, Wang J, Xi L, Huang WD, Liang J, Chen JG** (2009). RACK1 is a negative regulator of ABA responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **60**:3819-3833
16. **Hirsch AM, Fang Y** (1994). Plant hormones and nodulation: What's the connection? *Plant Molecular Biology* **26**:5-9

17. **Ishida S, Takahashi Y, Nagata T** (1993). Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein β subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11152-11156
18. **Islas-Flores T, Guillén G, Islas-Flores I, San Román-Roque C, Sánchez F, Loza-Tavera H, Bearer E, Villanueva MA** (2009). Germination behavior, biochemical features and sequence analysis of the RACK1/arcA homolog from *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plantarum* **137**:264-280
19. **Iwasaki Y, Komano M, Ishikawa A, Sasaki T, Asahi T** (1995). Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty-amino-acid repeat (WD-40 repeat). *Plant Cell Physiol.* **3**:505-510
20. **Kiyosue T, Ryan C** (1999). The Electronic Plant Gene Register. *Plant Physiol.* **119**:1567-1568
21. **Kraus S, Gioeli D, Vomastek T, Gordon V, Weber MJ** (2006). Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) and Src Regulate the Tyrosine Phosphorylation and Function of the Androgen Receptor. *Cancer Res.* **66**:11047-11054
22. **Kumagai H, Hakoyama T, Umehara Y, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Kouchi H** (2007). Protein, IGN1, Is Required for Persistence of Nitrogen-Fixing Symbiosis in Root Nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **143**:1293-1305
23. **Kwak J, Kim S, Lee S, Oh S-A, Byoun C-H, Han J-K, Nam H** (1997). cDNA clone with high similarity to a mammalian receptor for activated protein kinase C. *Planta* **201**:245-251
24. **McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ** (2002). The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Molecular Pharmacology* **62**:1261-1273

25. **McKhann H, Frugier F, Petrovics G, Coba de la Peña T, Jurkevitch E, Brown S, Kondorosi E, Kondorosi A, Crespi M** (1997). Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): a role in hormone-mediated cell division? *Plant Mol. Biol.* **34**:771–780
26. **Nakashima A, Chen L, Thao NP, Fujiwara M, Wong HL, Kuwano M, Umemura K, Shirasu K, Kawasaki T, Shimamoto K** (2008). RACK1 Functions in Rice Innate Immunity by Interacting with the Rac1 Immune Complex. *The Plant Cell* **20**:2265-2279
27. **Nielsen N, Beilinson V, Bassüner R, Reverdatto S** (2001). A G β -like protein from soybean. *Physiologia Plantarum* **111**:75-82
28. **Oldroyd GED, Downie JA** (2008). Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**:519–46
29. **Ron D, Chen C-H, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D** (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: A homolog of the β subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:839-843
30. **Saito A, Fujii G, Sato Y, Gotoh M, Sakamoto M, Toda G, Hirohashi S** (2002). Detection of genes expressed in primary colon cancers by in situ hybridisation: overexpression of RACK 1. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* **55**:34-39
31. **Ullah H, Scappini EL, Moon AF, Williams LV, Armstrong DL, Pedersen LC** (2008). Structure of a signal transduction regulator, RACK1, from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Science* **17**:1-10
32. **Valdés-López O, Huertero-Arenas C, Ramírez M, Girard L, Sánchez F, Vance C, Reyes JL, Hernández G** (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant, Cell and Environment* 1-10

FIGURE LEGENDS

Figure 1.

Comparative expression analysis of the *PvRACK1* gene throughout an 18 day nodulation kinetics (A) and of the effect of hormones on the *PvRACK1* gene during root development (B). In (A), amplification by RT-qPCR was performed in triplicates and normalized to the average of one reference gene (*PvIEF1*). The quantified RNA was analyzed after harvesting from uninoculated roots (r), post-inoculated roots (R) and root-nodules (N), at the indicated number of days. In (B), *Phaseolus vulgaris* seedlings were treated with 10 mM ABA, 25 mM IAA, 25 mM kinetin or 10 mM GA4 for 1, 3, 6 and 9 days. Total RNA was extracted and analyzed by quantitative RT-PCR. Expression levels of *PvRACK1* were normalized to *PvIEF1*. The values represent the normalized +hormone/-hormone fold expression as the average of three replicates (log2-converted).

Figure 2.

PvRACK1-knockdown phenotype. Examples of morphological phenotypes of root nodules resulting from *PvRACK1*-knockdown (C) compared with wild type (A) and control (B). (D) Nodule number (left side of graphic) and Real Time RT-PCR analysis (right side of graphic) from mRNA levels when *PvRACK1*-RNAi was expressed (1RNAi, 2RNAi and 4RNAi) in individual transgenic roots (solid bar) and nodules (empty bar), and compared to those of hairy root (K599) and control (empty vector). Amplification by Real Time RT-PCR was performed in triplicates and normalized to the average of one reference gene (*PvIEF1*).

Figure 3.

Conventional light microscopy of structural features from *PvRACK1*-knockdown and control nodules at 26 dpi. Light micrographs were taken from microtome slices prepared from *PvRACK1*-knockdown (C, Inset, and D) and control (A, Inset, and B) nodules, and stained with toluidine blue.

Figure 4.

Quantification of cell size in infected and uninfected cells from control (K599) and *PvRACK1*-knockdown nodules. The graph shows the cell area of infected (empty bars) and uninfected (solid bars) cells. Insets show the areas from representative cells from control infected (K599) and *PvRACK1*-knockdown nodules. n=number of measured cells in sample. Area was measured in μm^2 .

Figure 5.

Ultrastructural features of control, and *PvRACK1*-knockdown nodules by electron microscopy. (A-D) Twenty six dpi control nodules. (E-H) Twenty six dpi *PvRACK1*-knockdown nodules. In A, the nucleus (Nu) and bacteroids (B) of an infected cell are shown. In C, the peroxisomes (PX; solid line arrows), nucleus, vacuole (V) and cell wall (CW) of uninfected cells (UIC) are clearly observed, as well as the intracellular space (ICS) and an adjacent infected cell (IC). Dashed line arrows depict the peribacteroid membrane (PBM) in C; in D, bacteroids (B), matrix (M), a bacteroid with a polyhydroxybutyrate granule (PHB), and mitochondria (Mit) are clearly distinguished. On the other hand, in *PvRACK1*-knockdown nodules, both uninfected and infected cells show lack of integrity

(E and F), and bacteroids are in the process of disintegration (G and H). H shows the magnified central area of G.

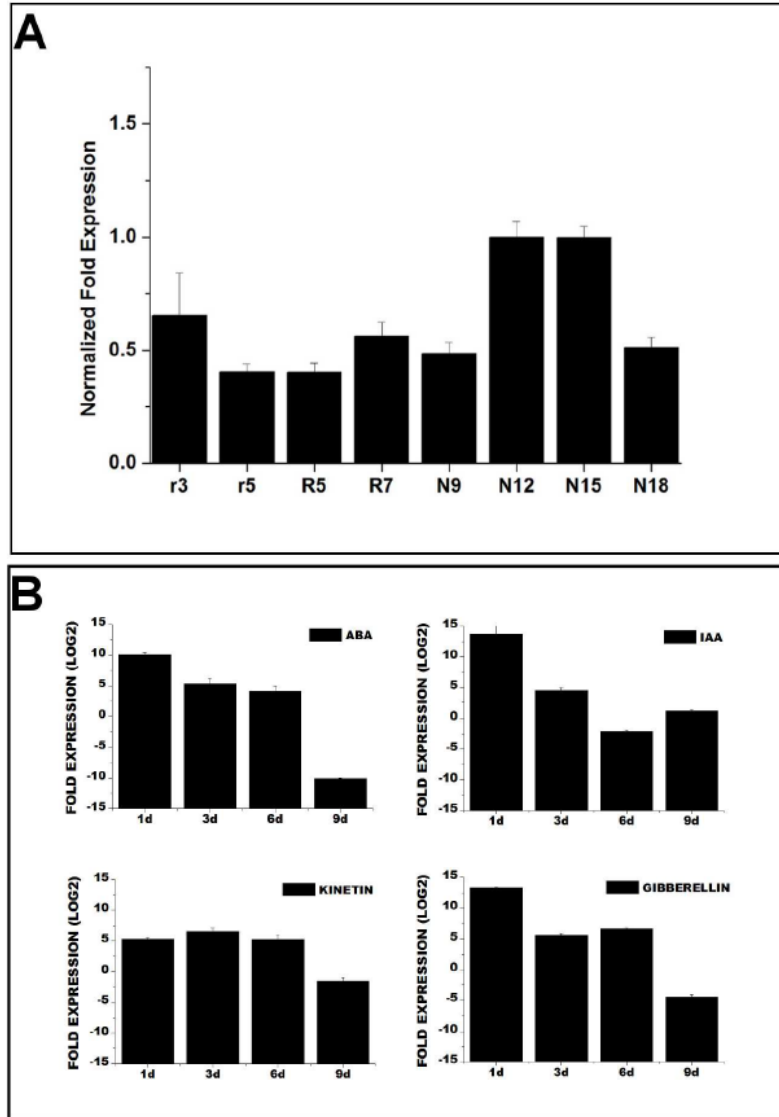


Figure 1. *PvrACK1* expression analysis during nodulation (A), and effect of hormones on its expression during root development (B).
 114x162mm (300 x 300 DPI)

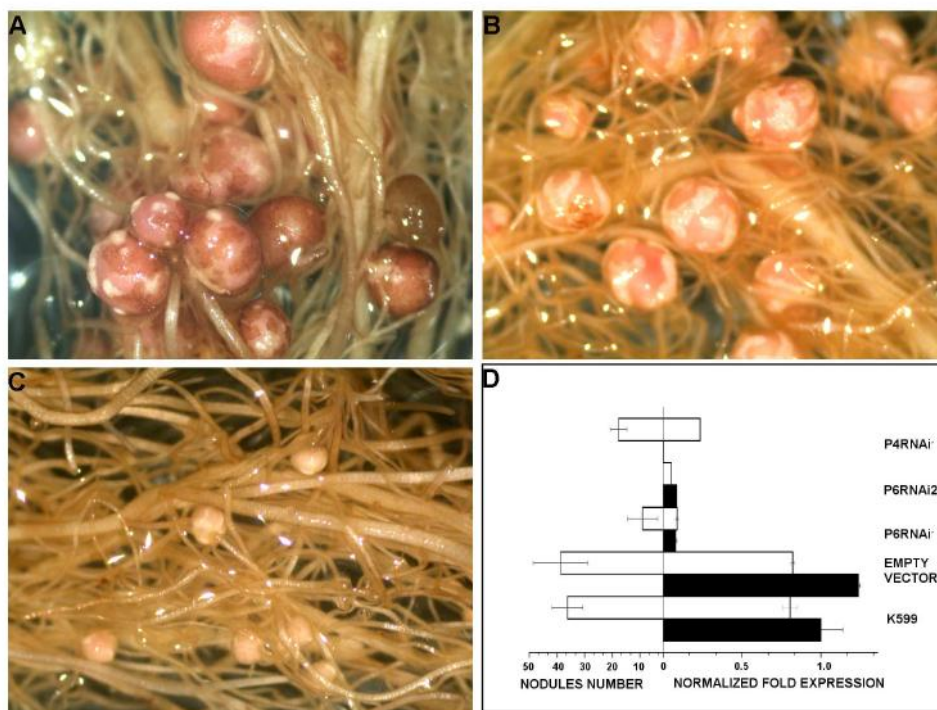


Figure 2. Nodule phenotype and number in control and *PvRACK1*-knockdown nodules.
156x116mm (300 x 300 DPI)

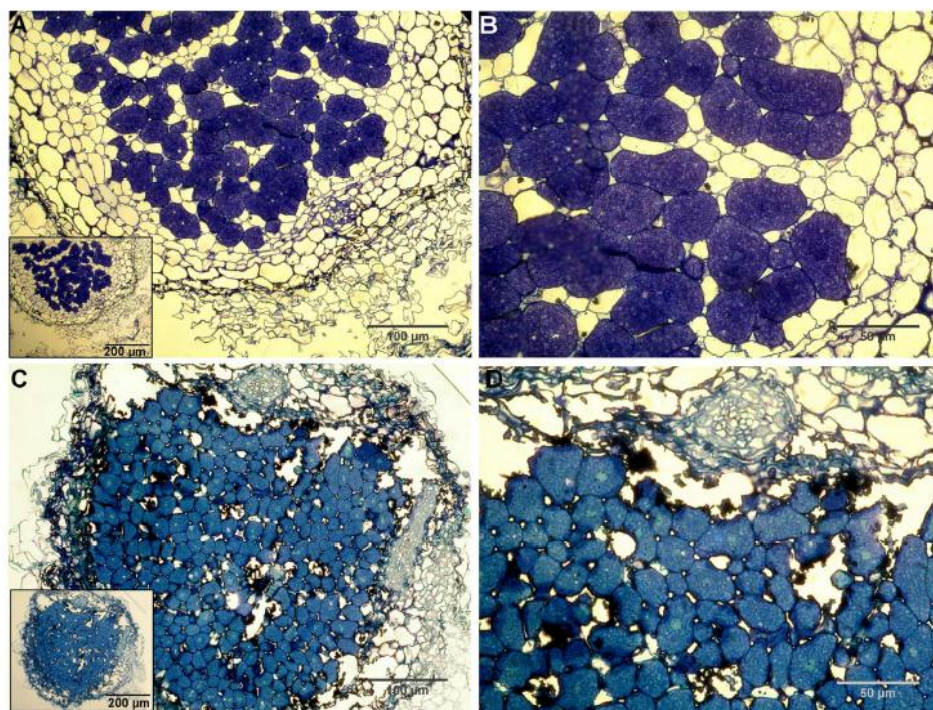


Figure 3. Microscopic analysis of *PvRACK1*-knockdown nodules.
182x138mm (300 x 300 DPI)

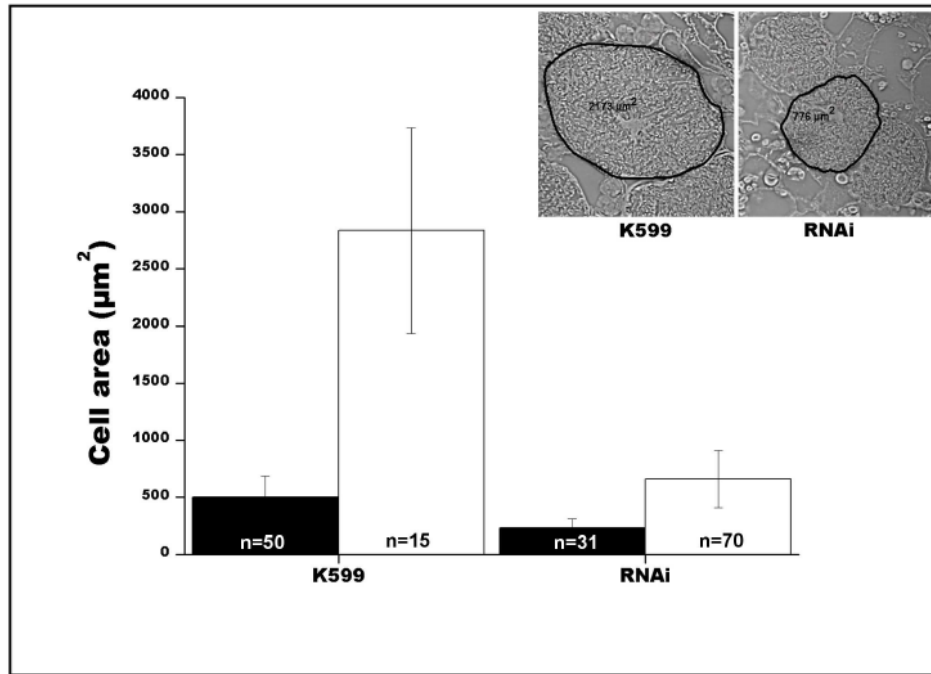


Figure 4. Quantitation of cell area in control and *PvRACK1*-knockdown nodules.
185x137mm (300 x 300 DPI)

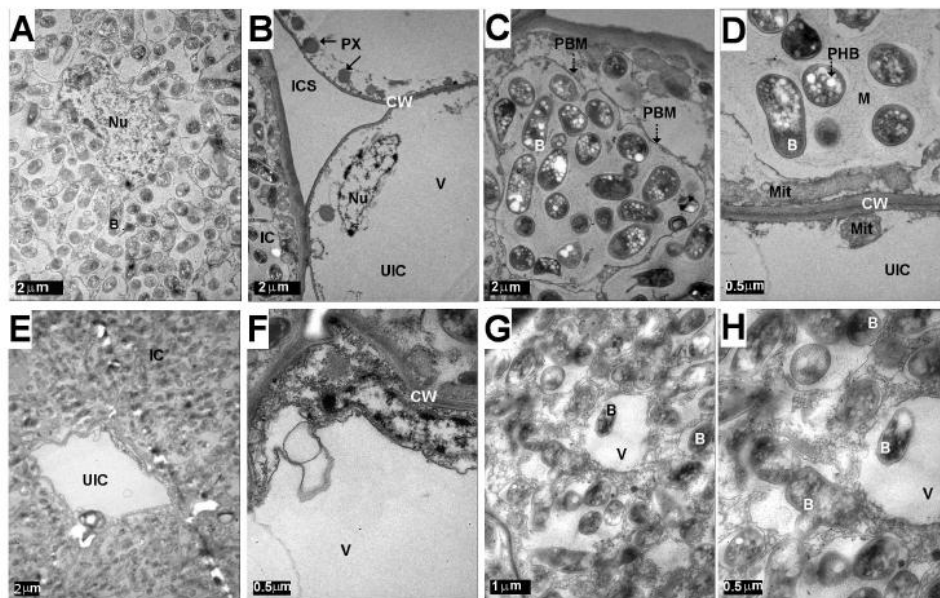


Figure 5. Ultrastructural analysis of cells and bacteroids in *PvRACK1*-knockdown nodules compared to control.

181x117mm (300 x 300 DPI)