



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

**“DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE  $\text{Ca}^{2+}$   
INTRACELULAR DURANTE LA SIMBIOSIS ENTRE  
RHIZOBIA Y LEGUMINOSAS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

**L. en C. Liliana Martínez Lara**

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS CÁRDENAS TORRES

CUERNAVACA, MORELOS; JUNIO 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.

## ÍNDICE.

	Página
Índice.....	2
Índice de figuras.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
La simbiosis entre las plantas leguminosas y rhizobia.....	5
Señalización molecular en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	5
Los pelos radicales.....	9
El Ca <sup>2+</sup> y su participación en la simbiosis.....	10
Enfoques tradicionales para la medición de calcio intracelular en células vegetales.....	13
La proteína Camaleón: un indicador fluorescente sensible a Ca <sup>2+</sup> .....	14
ANTECEDENTES.....	18
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
METODOLOGÍA.....	25
Esquema metodológico.....	25
Desinfección y germinación de las semillas de <i>Lotus japonicus</i> .....	25
Desinfección y germinación de las semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	25
Desinfección y germinación de las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	26
Transformación de <i>Mesorhizobium loti</i> con el plásmido <i>DsRed</i> .....	26
Inoculación de plantas leguminosas con su microsimbionte.....	26
Diseño de la construcción pK2GW7/YC3.60.....	27
Infiltración de <i>Nicotiana benthamiana</i> con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	27
Transformación de <i>Phaseolus vulgaris</i> con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	28
Preparación de las plántulas para su observación en el microscopio.....	28
Adquisición de las imágenes.....	28
Procesamiento de las imágenes.....	29
RESULTADOS.....	31
Generación de las líneas transgénicas de <i>Lotus japonicus</i> con la construcción de Camaleón versión 2.1.....	31
Caracterización de las líneas transgénicas que expresan la proteína Camaleón.....	32
Determinación de los niveles de Ca <sup>2+</sup> intracelular de los pelos radicales de las plantas transgénicas de <i>Lotus japonicus</i> .....	33
Determinación de los niveles de Ca <sup>2+</sup> citoplásmico de los pelos radicales tratados con el ionóforo de calcio (Ionomicina).....	37
Determinación de los niveles de Ca <sup>2+</sup> citoplasmático de los pelos radicales inoculados con <i>Mesorhizoibum loti</i> .....	38

	Página
Determinación de los niveles de Ca <sup>2+</sup> intracelular de los pelos radicales de las plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan una nueva versión de Camaleón YC3.60.....	41
Diseño de la construcción YC3.60.....	44
Determinación de los niveles de Ca <sup>2+</sup> intracelular de las hojas transgénicas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	45
Determinación de los niveles de Ca <sup>2+</sup> intracelular de los pelos radicales de las plantas compuestas de <i>Phaseolus vulgaris</i> en respuesta a los FN y a la inoculación con <i>Rhizobium</i> spp.....	46
Tratamiento con los factores de nodulación (FNs).....	47
Inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> (DsRed).....	51
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	62
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	63
FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura química de los factores Nod (FNs) de las diferentes especies de <i>Rhizobium</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Esquema general del intercambio de señales en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosas.....	8
<b>Figura 3.</b> Modelo de la vía de señalización durante la simbiosis.....	12
<b>Figura 4.</b> Esquema de la estructura de Camaleón.....	15
<b>Figura 5.</b> Esquema de la construcción de Camaleón YC2.1 con su promotor.....	16
<b>Figura 6.</b> Amplificación por PCR del fragmento de 785pb de las líneas de <i>Lotus japonicus</i> transformadas con Camaleón YC2.1.....	31
<b>Figura 7.</b> Estomas de hojas de <i>Lotus japonicus</i> transformadas con la construcción de Camaleón YC2.1.....	33
<b>Figura 8.</b> Niveles de calcio intracelular en el pelo radical de <i>Lotus japonicus</i> ...	36
<b>Figura 9.</b> Distribución del calcio intracelular a lo largo de un pelo radical.....	37
<b>Figura 10.</b> Nódulos de <i>Lotus japonicus</i> de 30 días post-inoculación con <i>Mesorhizobium loti</i> DsRed.....	40
<b>Figura 11.</b> Niveles de calcio intracelular en un pelo radical de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de la aplicación del ionóforo para calcio A23187.....	43
<b>Figura 12.</b> Niveles de calcio intracelular en células epiteliales de <i>Nicotiana benthamiana</i> que expresan la proteína YC3.60 después de la aplicación de A23187.....	46
<b>Figura 13.</b> Niveles de calcio intracelular en un pelo radical de <i>Phaseolus vulgaris</i> después de la aplicación de los FNs.....	48
<b>Figura 14.</b> Niveles de calcio intracelular en la región perinuclear de un pelo radical de <i>Phaseolus vulgaris</i> después de la aplicación de los FNs.....	50
<b>Figura 15.</b> Niveles de calcio intracelular en la región nuclear en un pelo radical de <i>Phaseolus vulgaris</i> después de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> DsRed..	52
<b>Figura 16.</b> Visualización del calcio intracelular durante el inicio de la formación del hilo de infección en plantas compuestas de <i>Phaseolus vulgaris</i> después de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> DsRed.....	53
<b>Figura 17.</b> Localización del calcio intracelular durante la formación del hilo de infección en plantas compuestas de <i>Phaseolus vulgaris</i> después de la inoculación con <i>Rhizobium tropici</i> DsRed.....	54
<b>Figura 18.</b> Localización del calcio intracelular en un primordio de nódulo de plantas compuestas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculada con <i>Rhizobium tropici</i> DsRed.....	56
<b>Figura a.</b> Infiltración de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	28
<b>Figura b.</b> Esquema de la adquisición y obtención de imágenes de las muestras analizadas para la proteína Camaleón.....	30
<b>Figura suplementaria A.</b> Niveles de calcio intracelular en pelos radicales de <i>Lotus japonicus</i> después de la aplicación de ionomicina.....	67
<b>Figura suplementaria B.</b> Esquema de la estructura del plásmido YC3.60, pK2GW7 y secuencia de oligonucleótidos.....	68

## **INTRODUCCIÓN.**

### **La simbiosis entre las plantas leguminosas y rhizobia.**

Una de las interacciones simbióticas más estudiadas en la naturaleza es la establecida entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las raíces de las plantas leguminosas. Este mecanismo natural resulta en beneficio humano al aportar la mayor fuente de nitrógeno al ambiente. Además, las plantas leguminosas resultan de gran interés agronómico, siendo el frijol el grano de mayor consumo directo por el hombre (Brock y Madigan, 1989).

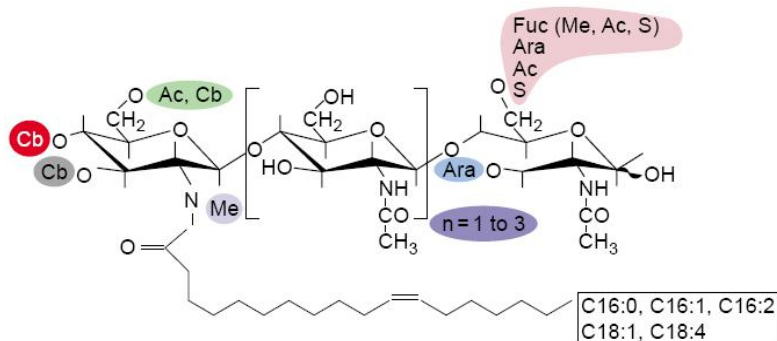
Las rizobiáceas son un grupo muy heterogéneo de bacterias que se han dividido en cuatro familias: Bradyrhizobiaceae, Hyphomicrobiaceae, Rhizobiaceae y Phyllobacteriaceae. Dentro de estas familias los géneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* son capaces de efectuar el proceso de la fijación biológica del nitrógeno formando asociaciones con plantas de la familia *Leguminosae* (revisado en Perret *et al.*, 2000).

De manera general la fijación biológica del nitrógeno consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, la cual se realiza por los rhizobios a través del sistema enzimático que poseen y este complejo está compuesto por la nitrogenasa (enzima cuyos co-factores son MoFe) y la nitrogenasa reductasa (cuyo co-factor es Fe). El complejo de la nitrogenasa es sensible de manera irreversible al O<sub>2</sub>; es por ello que los niveles de oxígeno en el nódulo tienen que ser finamente controlados para una fijación eficiente. El control sobre los niveles internos de O<sub>2</sub> se logra mediante la leghemoglobina, una de las proteínas más abundantes en el nódulo que captura el oxígeno a través del grupo hemo y es sintetizada por la planta (Brock y Madigan, 1989).

### **Señalización molecular en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.**

El proceso simbiótico que se efectúa entre la planta y la bacteria es altamente específico y requiere de un intercambio de señales químicas entre ambos participantes. Inicialmente, la planta leguminosa secreta compuestos que atraen a rhizobia por mecanismos quimio tácticos. Entre estos compuestos se encuentran los flavonoides y su reconocimiento permite la expresión de genes involucrados en la simbiosis (genes *nod*). Las proteínas codificadas por estos genes participan en la síntesis y secreción de los

“factores de nodulación” (FNs) (Lerouge *et al.*, 1990). Se sabe que los FNs son lipoquitooligosacáridos constituidos por un esqueleto de quitina, con cuatro o cinco unidades de N-acetilglucosamina que incluyen modificaciones químicas presentes en sus extremos reductor y no reductor. Estas modificaciones pueden ser metilaciones, sulfataciones, glicosilaciones, acetilaciones y acilaciones (Perret *et al.*, 2000) (Figura 1).



**Figura 1. Estructura química de los factores Nod (FNs) de las diferentes especies de *Rhizobium*.** Los diferentes colores indican sustituciones para H en los FNs que se pueden encontrar en las diferentes especies de *Rhizobium*. También se indican algunas de las variantes en la cadena ácido graso. Abreviaturas: Ac, acetil; Ara, arabinosil; Cb, carbonil; Fuc, fucosil; Me, metil; S, sulfidril (Cullimore *et al.*, 2001).

Los FNs purificados (libres de la bacteria) son capaces de inducir en la planta reacciones similares a las que produce rhizobia durante las etapas tempranas de la nodulación; sin embargo, se requiere la presencia de la bacteria para llevar a cabo el proceso de infección. La percepción de los FNs por la planta junto con la bacteria inducen una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en la raíz; como la deformación de los pelos radicales, la reactivación de la mitosis en las células corticales, rearrreglos en la estructura de los filamentos de actina, la formación del hilo de infección y en algunos casos, la formación de estructuras que asemejan a los nódulos, además se ha reportado que se modifica la expresión de algunos genes (Schultze and Kondorosi, 1998; Cárdenas *et al.*, 2000).

Los pelos radicales son células epidérmicas de forma tubular con crecimiento polarizado que permiten la invaginación de la membrana plasmática para la formación del hilo de infección. Son células de fundamental importancia durante la simbiosis, ya que en cierto sentido constituyen la puerta de entrada del simbiote. Los FNs por sí

solos inducen una serie de respuestas en los pelos radicales, de las cuales han sido descritas, el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  pocos segundos después de percibir los FNs seguido por un eflujo de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , lo cual lleva a la despolarización transitoria de la membrana plasmática (Felle, 1995). Minutos después se observan oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región perinuclear (Ehrhardt *et al.*, 1996; Cárdenas *et al.*, 1999). Las implicaciones biológicas de estas respuestas serán discutidas más adelante.

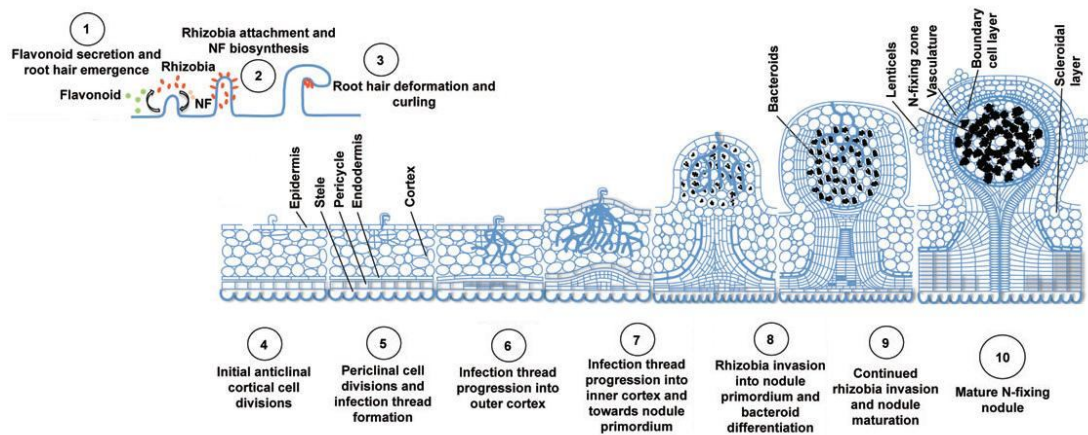
La formación del nódulo fijador de nitrógeno requiere de la presencia de *Rhizobium*. Uno de los primeros pasos en la interacción es la adherencia de la bacteria a los pelos radicales de la planta. A este nivel, algunos grupos de trabajo han propuesto que las lectinas podrían tener un papel importante en este reconocimiento (Hirsch, 1999). Una vez establecida la unión algunos de los pelos radicales sufren una deformación, la cual va acompañada por la división de las células del córtex y la inducción de la expresión de genes específicos del proceso simbiótico como son las nodulinas; las etapas previas al establecimiento del nódulo se consideran como respuestas tempranas, por lo tanto, las nodulinas expresadas durante esta etapa se consideran como nodulinas tempranas (revisado en Ferguson *et al.*, 2010).

El enroscamiento del pelo radical (“curling”, en inglés) es un evento importante, ya que permite atrapar a las bacterias en el centro del enroscamiento y estimular *in situ* la secreción de los FNs teniendo un efecto sobre los pelos radicales. Cuando la bacteria inicia la estimulación de la célula huésped (el pelo radical) ocurre una serie de eventos que permiten que la membrana plasmática, al igual que la pared celular, se invagine y formen una nueva estructura; el hilo de infección. Este proceso comienza con la hidrólisis de la pared celular en la región del enroscamiento, el cual es seguido por una invaginación de la membrana y la formación de una nueva pared celular. La formación de esta estructura sería incomprensible sin la reestructuración del citoesqueleto y la maquinaria exocítica y endocítica que permite el crecimiento celular (revisado en Ferguson *et al.*, 2010). De aquí la gran importancia que adquiere el pelo radical sobre todo en el aspecto de los mecanismos moleculares y celulares que tienen que reorganizarse para cambiar el patrón de crecimiento apical.

Posteriormente, el hilo de infección atraviesa el pelo radical y finalmente llega a las células del córtex de la raíz. Estas células, paralelamente al inicio de la formación del hilo de infección, entran en un proceso de división mitótica que da lugar a la formación



de un primordio en el córtex externo (en nódulos determinados) o en el córtex interno (en nódulos indeterminados). Cuando el hilo de infección alcanza las células del primordio, se ramifica en la vecindad de estas células y ocurre uno de los procesos más desconocidos en la interacción simbiótica. Las bacterias son liberadas del hilo de infección al citoplasma de las células del primordio por un mecanismo de exocitosis y a su vez son internalizadas por las células huésped por un proceso de endocitosis. Durante este proceso los rhizobios quedan separadas del citoplasma por una membrana que en realidad proviene de la planta hospedera, a la cual se le conoce como membrana peribacteroidal (MPB), dentro de la cual la bacteria continúa su división. Al terminar el proceso de división celular, las bacterias se diferencian en células conocidas como bacteroides, quedando rodeadas individualmente o en pequeños grupos por la MPB. A estos grupos de bacteroides se les llama simbiosomas, ya que adquieren la capacidad de poder fijar nitrógeno. Durante esta etapa, se expresa otro grupo de genes de la planta, las nodulinas tardías, las cuales tienen un papel muy importante en la fisiología del nódulo (revisado en Ferguson *et al.*, 2010).



**Figura 2. Esquema general del intercambio de señales en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas.** Los pelos radicales liberan compuestos flavonoides e inducen la expresión de los genes *nod* en los rhizobios; sus productos participan en la producción de los FNs (1 y 2). En respuesta, el pelo radical se deforma y enrosca, atrapando a las bacterias (3); al mismo tiempo inician las divisiones celulares en la capa subepidermal de la raíz (córtex) (4). Las bacterias avanzan por el pelo radical a través de un estructura denominada hilo de infección hasta alcanzar las células del córtex externo que se encuentran en división (5, 6 y 7); una vez ahí, las bacterias se liberan y se diferencian hasta formar los nódulos fijadores de nitrógeno (8, 9 y 10) (modificado de Ferguson B.J *et al.*, 2010).

### Los pelos radicales.

La mayoría de las plantas terrestres tienen pelos radicales que resultan del crecimiento localizado de las células epidérmicas de la raíz. Esto produce la formación de una

estructura tubular que se aleja de la base de la célula epidérmica, pero sigue siendo parte de la misma célula. Su función es aumentar la superficie y con ello la capacidad de la raíz para absorber el agua y los nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta, asimismo los pelos radicales perciben los cambios del medio, ya sea estímulos bióticos o abióticos (Taiz and Zeiger, 2002).

Debido a que los pelos radicales no se encuentran en división, y se elongan alejándose de la raíz, resultan un excelente modelo de estudio de diversos procesos celulares. Ya que su contenido interno es fácil de observar por microscopía de alta resolución y el ápice de las células se encuentran aisladas de la base de la raíz, ambas partes pueden ser analizadas *in vivo*. Además, en una misma planta se pueden tener los diferentes estados de desarrollo de los pelos radicales, facilitando el estudio de las distintas etapas: desde células recién emergidas hasta las que se encuentran senescentes, lo cual permite estudiar diversos procesos, como son: la polarización de la membrana plasmática, el mantenimiento de los flujos iónicos, la exocitosis y endocitosis dirigida (Meiri, 2005), así como la dinámica del citoesqueleto (Cárdenas *et al.*, 1998).

Los pelos radicales son células polarizadas con un crecimiento apical muy similar a los tubos polínicos al igual que las hifas de hongos filamentosos, las algas e incluso los conos neurales, son de especial interés el estudio del crecimiento apical; sin embargo, los pelos radicales de las leguminosas tienen una propiedad adicional; su capacidad de reorganización del citoesqueleto, así como el intercambio de señales con su simbionte. En este sentido, los pelos radicales constituyen el escenario perfecto para estudiar los mecanismos que permiten el establecimiento de la asociación simbiótica mediante la formación del hilo de infección, la entrada de la bacteria y como esta regulación se diferencia de las interacciones patogénicas donde la bacteria es rechazada.

### **El $\text{Ca}^{2+}$ y su participación en la simbiosis.**

En mamíferos se ha determinado que, dependiendo de la amplitud y la frecuencia entre las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  podría regularse la expresión de diferentes genes (Berridge, 1997). De manera similar se ha mostrado en plantas que oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden regular directamente el cierre de los estomas y la naturaleza de esta respuesta está definida por el período de las oscilaciones. Este es uno de los mejores ejemplos que

describen a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  como la responsable de contener la información biológica, cuya respuesta depende de la naturaleza de las oscilaciones (Allen *et al.*, 1999).

En tubos polínicos y pelos radicales se ha estudiado que las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen una relevancia fisiológica (Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Monshausen *et al.*, 2008). En estos modelos los cambios en los niveles de calcio definen en gran medida el comportamiento del crecimiento apical de estas células, el cual tiene un patrón de tipo oscilatorio. Asimismo, existen un gran número de proteínas descritas que podrían estar reguladas por estos cambios oscilatorios en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  en las células vegetales no solamente está limitado al crecimiento, la apertura y cierre de los estomas, sino que también está involucrado en la gran mayoría de las respuestas a diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos incluyendo la muerte celular programada y la expresión génica (Hepler *et al.*, 2005).

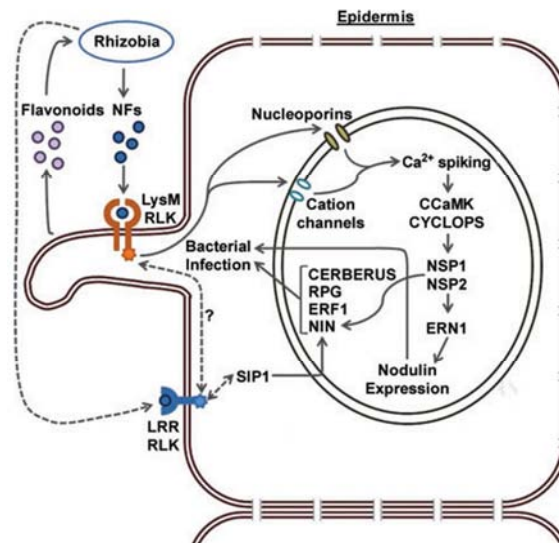
Los pelos radicales de las leguminosas responden a los FNs del *Rhizobium* con cambios en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  los cuales son esenciales para el establecimiento de la simbiosis. Uno de los primeros trabajos realizados fue mediante el uso de electrodos ión selectivo. Estos estudios permitieron demostrar que los FNs inducen de manera temprana, dentro de los primeros segundos, cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ápice de los pelos radicales los cuales se definieron como influjos tempranos (Cárdenas *et al.*, 1999; Cárdenas *et al.*, 2000). Sin embargo, esta respuesta inicial en el incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  no es la única, ya que es seguida por otra respuesta que tiene lugar de 10 a 15 minutos después de la percepción de los FNs. Esta segunda respuesta, que consideramos tardía, se caracteriza por su comportamiento oscilatorio y su localización en la región perinuclear (Oldroyd and Downie, 2006); por lo tanto estas dos respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  están separadas tanto espacial como temporalmente dentro de la misma célula (Cárdenas *et al.*, 2000).

Mediante el análisis de mutantes en leguminosas modelo; se han identificado un gran número de actores moleculares en la vía de señalización de la simbiosis de rhizobia con plantas leguminosas. Estos estudios han permitido definir el papel de varias proteínas en la vía de señalización de la percepción de los FNs. Dentro de ellas se encuentran los receptores tipo cinasa (RLK, por sus siglas en inglés) presentes en las células epidérmicas que son responsables del reconocimiento de los FNs (Limpens *et al.*, 2005; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003; Indrasumunar 2007; Indrasumunar *et al.*,

2009). Otra proteína relevante en esta interacción es el receptor tipo cinasa que ha diferencia del ejemplo anterior, consta de secuencias repetidas abundantes en leucina (LRR, por sus siglas en inglés). Este segundo receptor tiene una particular importancia, ya que además de requerirse para la simbiosis con *Rhizobium*, también se requiere para el establecimiento de las micorrizas (Endre *et al.* 2002; Stracke *et al.* 2002; Mitra *et al.* 2004; Capoean *et al.* 2005; Indrasumunar 2007).

Las proteínas que tienen un papel importante en la vía de señalización del  $Ca^{2+}$  son los canales iónicos localizados en la membrana nuclear los cuales son codificados por los genes *MtDM11*, *LjCASTOR* y *LjPOLLUX* (Ané *et al.* 2004; Imaizumi-Anraku *et al.* 2005; Riely *et al.* 2007). Adicionalmente, se encuentran dos nucleoporinas, que en el caso de *Lotus*, están codificadas por *LjNup133* y *LjNup85* (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007). Sin duda alguna, uno de los actores moleculares de gran importancia es la proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK, por sus siglas en inglés) (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004). La familia de proteínas CCaMK adquiere un especial interés durante la simbiosis porque en células animales se les ha relacionado con la capacidad de responder a firmas oscilatorias de  $Ca^{2+}$  (Levy *et al.*, 2004). Esto resulta de gran relevancia ya que tendrían la capacidad de responder a las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  observadas en la región perinuclear. Además, se ha sugerido que los blancos de esta proteína cinasa CCaMK podrían ser *NSP1* (Nodulation Signal Pathway 1) y *NSP2* (Nodulation Signal Pathway 2), los cuales presentan una alta identidad con genes de la familia de los activadores transcripcionales (GRAS, por sus siglas en inglés), que son requeridos para la señalización inducida por los FNs. Este papel esencial lo demuestran las mutaciones en estos genes, los cuales generan fenotipos  $Nod^-$  (no hay nodulación) y  $Mic^+$  (formación de micorrizas). El hecho de que mutaciones en *DMI3* (Doesn't make infection 3) generan fenotipos  $Nod^-$  refuerza la idea de un papel clave durante la simbiosis. Esta evidencia se ve favorecida con los datos de mutantes en esta proteína cinasa que simulan una actividad de cinasa constante. El fenotipo que resulta de esta mutantes se caracteriza por la capacidad de formar nódulos espontáneos, es decir, en ausencia de la bacteria y de los FNs. Tanto *DMI3*, *NSP1* como *NSP2* tienen una localización nuclear y su ubicación es relevante en la vía de señalización inducida por los FNs porque las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  se dan en la región perinuclear de los pelos radicales (Ehrhardt *et al.*, 1996; Cárdenas *et al.*, 1999; Wais *et al.*, 2002; Cárdenas *et al.*, 2005), lo cual sugiere que los cambios en los niveles de  $Ca^{2+}$  son los activadores de

DMI3, lo cual a su vez fosforila a NSP1 y a NSP2, que finalmente activan la transcripción de genes importantes en la nodulación, las nodulinas (Brewin, 1993; Bolle, 2004; Ehrhardt *et al.*, 1996 ) (Figura 3).



**Figura 3. Modelo de la vía de señalización durante la simbiosis.** Cuando rhizobia percibe los flavonoides liberados en la rizósfera por la leguminosa, son atraídos a la raíz, en donde estimulan la producción y liberación de los factores nod (FNs). Los FNs son reconocidos en la superficie del pelo radical por receptores tipo cinasa (LysM RLK y repetidos ricos en leucina, LRR RLK), cuya fosforilación podría permitir el influjo del  $Ca^{2+}$  extracelular y/o liberar el  $Ca^{2+}$  intracelular de las pozas internas al citoplasma por medio de canales iónicos. Las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  reportadas en el núcleo, podrían activar la proteína cinasa nuclear dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK), la cual a su vez activaría a los reguladores transcripcionales tipo GRAS, NSP1 y NSP2 mediante fosforilación. NSP1 y NSP2 inducen la transcripción de los genes de nodulación tempranos, ocasionando que se deforme el pelo radical y permita la organogénesis de los nódulos (modificado de Ferguson B.J *et al.*, 2010).

Existen estudios genéticos y bioquímicos mediante interacciones proteína-proteína que han permitido identificar interactores moleculares con CCaMK, los cuales son necesarios para la señalización de los FNs y el desarrollo del nódulo. Dentro de estas proteínas se encuentra LjCYCLOPS (Messinese *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008). Sin embargo, el aspecto modulador central de esta vía de señalización recae en la CCaMK, que se ha reportado que en el carboxilo terminal tiene una estructura secundaria tipo coiled-coil, el cual traduce la señal de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  y regula la expresión de NSP1 (Smit *et al.*, 2005). De nueva cuenta, existe un papel evidente del  $Ca^{2+}$  en la vía de señalización durante la simbiosis nos indica su importancia para llevar a cabo este

proceso y la necesidad de poder contar con nuevas herramientas que nos permitan estudiar los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  de una manera menos invasiva y durante etapas distintas del proceso de infección.

### **Enfoques tradicionales para la medición de calcio intracelular en células vegetales.**

Los compuestos fluorescentes o fluoróforos sensibles a la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se han descrito desde hace mucho tiempo. Los fluoróforos que pueden ser sensibles a la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se pueden dividir en dos grupos: cualitativos y cuantitativos.

Los que solamente son sensibles a la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentan su intensidad de fluorescencia conforme aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo que se denominan cualitativos (en inglés, “non-ratiometric”). Este tipo de fluoróforos pueden ser utilizados con gran éxito en células donde el volumen citoplásmico es relativamente homogéneo.

Sin embargo, en los sistemas en donde el citoplasma se encuentra notablemente acumulado en una región particular, la interpretación de los datos puede ser más difícil. Es decir, que si bien se pueden obtener datos cualitativos como el aumento o la disminución de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , no su distribución subcelular, debido a que el volumen accesible en el citoplasma es diferencial y por consecuencia la distribución de la señal fluorescente también lo es. Esto tiene una razón muy básica, la señal de fluorescencia se acumulara más en las zonas en donde el citoplasma sea más abundante. Esta limitación impulsó el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes cuantitativas sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos colorantes se definen como fluoróforos cuantitativos (en inglés, “ratiometric”), y la característica de estos colorantes es que tienen la capacidad de absorber la luz a determinada longitud de onda y su emisión aumenta en cuanto los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentan (esta respuesta es similar a las sondas cualitativas). Sin embargo, tienen la propiedad de poder excitarse a otra longitud de onda generando una emisión que no cambia dependiendo de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta capacidad de poder presentar este pico de absorción y de emisión independiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  conforma una sonda ideal para la medición cuantitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ . La razón es que se puede abstraer la señal dependiente del volumen accesible y de esta manera obtener el cociente que nos define el aumento cuantitativo en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

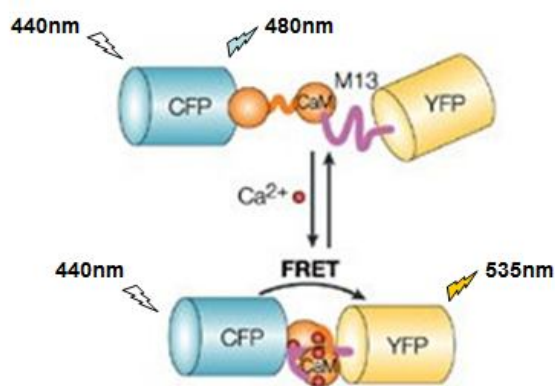
Por esta razón, las sondas fluorescentes cuantitativas son las sondas de elección para determinar la distribución subcelular y los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera precisa y versátil, ya que pueden ser estudiados los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en varias regiones de la célula y ser visualizados al mismo tiempo.

El empleo de las sondas fluorescentes ha proporcionado diversos resultados, sin embargo existen dificultades para el estudio de células vegetales con respecto a las células animales, como es la presencia de una pared celular bastante rígida que no permite fácilmente el acceso por difusión de estas sondas, por lo que se tienen que introducir por microinyección, lo cual en sí, representa un reto metodológico. Existen los fluoróforos en su forma esterificada que en células animales funcionan bastante bien, ya que son fácilmente permeables a la membrana. Una vez dentro de las células, con la actividad interna de las esterasas, los grupos ésteres se rompen y hacen a la sonda impermeable, por lo que quedan atrapados en el citoplasma. De esta forma es posible realizar las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . En células vegetales, las esterasas también se encuentran en la pared celular, inhiben la entrada de las sondas fluorescentes, además, la sonda que permanece atrapada en la pared celular muchas veces puede dar una falsa interpretación de las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que en este compartimento existen altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalmente, otra de las limitaciones más importantes de estas sondas es, que a pesar de ser excelentes reporteros para mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, no pueden ser utilizados por periodos de tiempo largos, ya que las sondas fluorescentes tienden a foto-blanquearse (en inglés, “photo-bleaching”). Las nuevas alternativas que se describen a continuación.

### **La proteína Camaleón: un indicador fluorescente sensible a $\text{Ca}^{2+}$ .**

Las proteínas camaleones son indicadores fluorescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  que representan diferentes versiones de la proteína GFP (“Green Fluorescent Protein”, por su nombre en inglés). Éstas presentan distintas longitudes de onda de emisión y de excitación y con el tiempo se han hecho mejoras en el diseño de las mismas, ya sea para hacerlas más fotoestables o para darles la capacidad de ser más brillantes y menos dependiente de los cambios o variaciones de pH. El Camaleón es una proteína quimérica de aproximadamente 72 kDa que se generó como resultado de la fusión de la proteína CFP (“Cyan Fluorescent Protein”, por su nombre en inglés) y la proteína YFP (“Yellow Fluorescent Protein”, por su nombre en inglés), además, las proteínas Camaleón están

constituidas por una región de calmodulina (CaM), y del dominio de unión a CaM de la miosina de músculo esquelético (región M13) (Miyawaki *et al.*, 1997) (Figura 4).



**Figura 4. Esquema de la estructura de Camaleón.** En azul se encuentra la proteína CFP, en amarillo la proteína YFP, CaM es la región de calmodulina y M13 la región de la miosina del músculo esquelético (modificado de Zhang *et al.*, 2002).

Este diseño ha permitido la generación de una proteína quimérica que tiene la posibilidad de funcionar como un sensor a  $Ca^{2+}$ . Este proceso se da cuando el  $Ca^{2+}$  se une a la región CaM y el dominio puede formar un complejo estable con la región M13, generando así un cambio intramolecular en la proteína de una forma extendida a una conformación más compacta. Este cambio de estructura tiene una función muy particular, ya que implica que el módulo de CFP y YFP se encuentren lo suficientemente cerca como para permitir el fenómeno de transferencia de energía de fluorescencia en resonancia (FRET, en inglés “Fluorescence Resonance Energy Transfer”). Esto sucede porque el espectro de emisión de CFP sobrelapa con el de excitación de YFP (Miyawaki *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002; Miyawaki, 2003), es decir, se puede excitar a la CFP y tener emisión de YFP debido a que la emisión del primero se utiliza para excitar al segundo. Este proceso es completamente reversible ya que cuando el  $Ca^{2+}$  se disocia de CaM el fenómeno de FRET disminuye proporcionalmente. Camaleón se ha utilizado de manera muy amplia como un indicador radiométrico del  $Ca^{2+}$  libre del citoplasma en plantas transformadas genéticamente, y por lo tanto es una sonda molecular de elección para experimentos menos invasivos.



Existen diversas modificaciones que se han realizado a Camaleón. Dentro de las nuevas versiones se encuentran las YC3 (“Yellow Cameleon 3”, por su nombre en inglés) y YC4 (“Yellow Cameleon 4”, por su nombre en inglés), que son indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  de baja afinidad con mutaciones en el asa de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de la región de CaM, lo cual permite que sean más resistentes a la acidificación. Actualmente, se continúan realizando mejoras en el diseño de los YCs, una de ellas es el cambio de YFP por EYFP.1 (“Enhanced Yellow Fluorescent Protein”, por su nombre en inglés), dando lugar a la nueva generación de camaleones, YC2.1 y YC3.1. En este trabajo, utilizamos la construcción del camaleón YC2.1 (Figura 5) y la versión YC3.60. La YC2.1 tiene un rango dinámico mejor que las versiones anteriores, además ha sido utilizada previamente para medir cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de células guarda de *Arabidopsis* (Allen *et al.*, 1999) así como para medir oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en pelos radicales de *Medicago truncatula* (Miwa *et al.*, 2006).



**Figura 5. Esquema de la construcción de Camaleón YC2.1 con su promotor.** A partir de la región N-terminal, la organización de camaleón consiste en la proteína cyan fluorescente (CFP - rectángulo azul), calmodulina (CaM - rectángulo morado), un segmento de unión a calmodulina (M13 – rectángulo morado), la proteína amarilla fluorescente (YFP – rectángulo amarillo) terminando con un motivo de seis histidinas en el C-terminal (rectángulo café). El promotor proviene del virus de mosaico de la coliflor (35S – rectángulo verde).

La versión YC2.1 de camaleón tiene dos mutaciones (V68L y Q69K) en la proteína EYFP que permiten que la fluorescencia sea casi insensible a los cambios de pH dentro del rango fisiológico. La proteína camaleón YC2.1 presenta una curva de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  bifásica con dos constantes de disociación (100nM y 4.3 $\mu$ M), debido a los dos estados conformacionales que presenta la construcción. Esta es una característica importante en las proteínas camaleones porque les permite responder a un rango amplio de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libres presentes en la célula (Miyawaki *et al.*, 1999).

Otra de las variantes de la proteína camaleón es la versión YC3.60, la cual ha sido recientemente utilizada para medir cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de pelos radicales y en tubos polínicos de *Arabidopsis* (Iwano *et al.*, 2009). Ambas

versiones son eficientes en células vegetales y su rango dinámico permite estudiar los cambios en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares utilizando plantas que expresan el transgén de manera estable o transitoria.

### **ANTECEDENTES.**

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un ión involucrado en la señalización celular, es el segundo mensajero por excelencia que responde a estímulos ambientales bióticos y abióticos, hormonales y del desarrollo. En este sentido, es importante mencionar que difícilmente hay o existe una respuesta a nivel celular tanto en células animales como vegetales que no involucre al  $\text{Ca}^{2+}$  en su vía de señalización. En plantas, el  $\text{Ca}^{2+}$  regula un gran número de respuestas, como la apertura de los estomas, las interacciones con microorganismos patogénicos, simbióticos y el desarrollo de estructuras con crecimiento polarizado como son el tubo polínico y los pelos radicales. Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene funciones estructurales en la pared celular (revisado en Hepler *et al.*, 2001).

A la fecha, aun existen muchas dudas de cómo un ion involucrado en tantas vías de señalización puede resultar en una respuesta particular y específica. Una de las respuestas es que en la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  están involucrados varios aspectos como la magnitud de la señal, el lugar donde ocurre y el tiempo en que se lleva a cabo. Estas condiciones generan una determinada firma de  $\text{Ca}^{2+}$  que después de ser decodificada por la célula es capaz de inducir una respuesta específica. Es decir, que al igual que las ondas de radio, las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  llevan información importante tanto en su configuración AM (modulación de la amplitud) como FM (modulación de la frecuencia).

Aún no se conoce a detalle la maquinaria celular que interpreta y traduce la información llevada a cabo por las firmas de  $\text{Ca}^{2+}$  en las respuestas celulares apropiadas (Miwa *et al.*, 2006). Es importante notar que a la fecha se han descrito proteínas cinasas dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina que tienen la propiedad de activarse de manera dependiente de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que no descartamos que pronto entendamos como es que estos mecanismos de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  son decodificados. Lo que sí sabemos es que los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen un impacto notable en la actividad de múltiples proteínas, las cuales requieren de  $\text{Ca}^{2+}$  para activarse o inactivarse. Por otro lado el  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones elevadas puede ser tóxico para la célula por lo que tiene que ser bombeado hacia el exterior o capturado en los organelos intracelulares como el retículo

endoplásmico y la mitocondria, manteniendo así los niveles de reposo o basales en el orden submicromolar a través de bombas y canales presentes en las membranas de la célula (McCormack *et al.*, 2005).

En los pelos radicales de las plantas (células tubulares con un crecimiento apical) el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tiene un papel muy importante (Baluska *et al.*, 2002; Holstein, 2002; Aniento and Robinson, 2005; Hepler *et al.*, 2005). Los pelos son estructuras que mantienen una capacidad elevada de exocitosis y endocitosis en la región apical donde se mantiene el crecimiento activo, para lo cual es necesario mantener un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  el cual probablemente actúe como un regulador importante de estos eventos (Cárdenas *et al.*, 1999). Además, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región apical tienen un efecto notable en la organización del citoesqueleto y sobre la actividad de diversas enzimas, también involucradas en el mantenimiento del crecimiento, por ejemplo las NADPH oxidasas que para su funcionamiento requieren de  $\text{Ca}^{2+}$  y de esta manera producen especies oxígeno reactivas (EOR) que también son importantes para el crecimiento apical.

En células vegetales, la concentración libre basal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol es de aproximadamente de 100 a 200 nM, en el caso de los pelos radicales se acumula sobre todo en la base de la célula polarizada, pero puede aumentar a niveles micromolares en el ápice o domo de la célula. Como ya se mencionó anteriormente, este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  facilita la fusión de las vesículas secretorias con la membrana del ápice y regula las proteínas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que son necesarias para el crecimiento polar. Diversos grupos de investigación han realizado experimentos en plantas para probar esta hipótesis, por ejemplo, se han alterado los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en células como los tubos polínicos, las hifas y los pelos radicales, en las cuales se han observado que se generan cambios en el crecimiento de estas células. Estos experimentos son muy precisos, es decir, si se genera un gradiente artificial en otra parte de la célula, el crecimiento de la célula polarizada se redirecciona al nuevo sitio donde se impuso el nuevo gradiente (Malho and Trewavas, 1996; Bibikova *et al.*, 1997). Esto permite sugerir que los aumentos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  facilitan la polarización de la mayoría de los elementos moleculares que permiten la formación de un nuevo polo de crecimiento.

Durante la simbiosis los pelos radicales constituyen los sitios de entrada de la bacteria y el lugar donde se formarán los hilos de infección. El  $\text{Ca}^{2+}$  adquiere un interés especial

en esta simbiosis porque participa en las primeras etapas de la vía de señalización (Cárdenas *et al.*, 1999; Cárdenas *et al.*, 2006). Además, los cambios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen un efecto importante sobre la organización del citoesqueleto en general. Por lo tanto, se ha sugerido que los cambios inmediatos de  $\text{Ca}^{2+}$  observados en los pelos radicales de las leguminosas en respuesta a los FNs son los responsables de los cambios en la reorganización de los microfilamentos de actina (Cárdenas *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2008) y por consecuencia, en la estructura y morfología de los pelos radicales. Además, se sabe que en la reorganización de los microfilamentos de actina participan varias proteínas que para su actividad dependen de  $\text{Ca}^{2+}$  y que tienen la capacidad de romper y reorganizar a los microfilamentos como el factor depolimerizador de actina (ADF), villina, gelsolina, etc. (Hussey, 1998; Vidali, 2001; Chen *et al.*, 2003).

En la vía de señalización de la simbiosis de rhizobia con las plantas leguminosas se han identificado proteínas que podrían tener un papel importante en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ , como es el caso de MtDMI3 y su ortólogo *SYM15* en *L. japonicus*, proteínas cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina (CCaMK) (Mitra *et al.*, 2004). A la familia de proteínas CCaMK, se les ha relacionado con la capacidad de responder a firmas oscilatorias de  $\text{Ca}^{2+}$  en células animales (Levy *et al.*, 2004). El papel central de esta cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina en las plantas leguminosas radica en el hecho de que se les ha caracterizado como esencial para el proceso simbiótico y hasta ahora son los candidatos más fuertes para decodificar las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por los FNs en la región perinuclear. Finalmente, la importancia de esta cinasa recae en la capacidad de poder activar los factores transcripcionales (NSP1 y NSP2) en las plantas leguminosas. Este hecho se encuentra bien documentado y mutantes con ganancia de función en la CCaMK resultan en la capacidad de inducir nódulos espontáneos en ausencia de los FNs o la bacteria (Gleason *et al.*, 2006).

En los últimos años se han descrito diversas metodologías para estudiar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células vegetales como, el uso de colorantes fluorescentes sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ ; Fura-2, en su forma acetoximetilester (Fura-AM). Esta presentación del colorante tiene la característica de ser muy permeable permitiendo su paso por la membrana plasmática. Una vez en el interior de la célula, el colorante entra en contacto con las esterasas intracelulares y se de-esterifica. Esta de-esterificación, que consiste en una modificación química que permite que se genere una forma no permeable es importante ya que la sonda se puede retener en el citoplasma de la célula de interés. Sin embargo, la

aplicación de Fura-AM tiene limitantes en algunas células vegetales, que estas sondas fluorescentes son muy pequeñas y una vez dentro del citoplasma puede eventualmente ser secuestrada en las vacuolas. Esto constituye una gran desventaja ya que cuando se registra la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  esta se encuentra dominada por la elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la vacuola y no es posible valorar la del citoplasma. Es por eso que en células vegetales se ha implementado la microinyección de compuestos fluorescentes como el Fura-2-Dextran, una forma conjugada de la sonda fluorescente con el grupo dextran de un peso molecular variable (10 a 80 kDa) lo cual favorece que la sonda se mantenga en el citoplasma de la célula de interés. Este enfoque presenta algunos inconvenientes durante su manejo, ya que implica cierto grado de destreza para no herir a la célula de manera irreversible al momento de microinyectarla, además de que sólo se puede microinyectar a una célula a la vez y se tiene que esperar un tiempo determinado para que la célula recupere sus funciones normales (Cárdenas *et al.*, 1999; Wais *et al.*, 2000). En general, el uso de sondas fluorescentes implica tener en consideración la localización de la sonda, es decir, el sitio en donde se requiere realizar las mediciones, su afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , que la sonda sea capaz de registrar los cambios en las condiciones celulares y considerar que después de cierto tiempo, la sonda fluorescente empieza a experimentar el fotoblanqueado y con ello una disminución considerable en la señal y el tiempo del experimento.

En este trabajo se propone estudiar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante los primeros segundos después de la adición de los FNs y también durante la formación del hilo de infección en presencia de la bacteria. Esto implica un gran reto ya que a la fecha no hay reportes sobre el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  durante los eventos que involucran a la bacteria, y mucho menos durante la inducción de la formación de los hilos de infección. Para lograr este objetivo, se utilizó un enfoque no invasivo como la nueva generación de proteínas verdes fluorescentes sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , particularmente Camaleón y se consideró que esta metodología será de gran utilidad para el estudio de las diferentes etapas a lo largo del proceso de infección. Las proteínas sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  han sido utilizadas exitosamente en diferentes tipos celulares como en el sistema nervioso de organismos transgénicos desde nemátodos, *Drosophila*, pez cebra y recientemente en ratones, sin embargo esta estrategia ha sido pobremente explotada en células vegetales.

Considerando los aspectos anteriores, resulta fundamental establecer métodos que involucren la obtención de líneas transgénicas de plantas que expresen el transgén del

Camaleón. Estas herramientas nos permitirán mantener a toda una población celular marcada con una sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  expresada genéticamente. Este enfoque dará la oportunidad de seleccionar de manera particular, a las células que están experimentando un estado específico de la simbiosis. Además, como la proteína se expresará continuamente, será posible realizar experimentos largos y se podrá recuperar la señal debido al blanqueado originado por la exposición a la luz de excitación (“photo-bleaching”). Por lo cual, la aplicación de este nuevo enfoque permitió tener una visión más amplia de lo que ocurre en la interacción de las plantas leguminosas con *Rhizobium*, ya que además de medir los cambios de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, en un futuro se podrán estudiar los eventos en los que se encuentre participando el  $\text{Ca}^{2+}$ .

## **HIPÓTESIS.**

Durante el crecimiento y en la percepción de los factores de nodulación, la distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los pelos radicales de leguminosas juega un papel importante, por lo tanto durante la infección con el microsimbionte se tendrá que mantener una distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  en la formación del hilo de infección.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Utilizar Camaleón como sonda molecular para analizar la distribución en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en pelos radicales vivos de plantas leguminosas durante la infección con su microsimbionte.

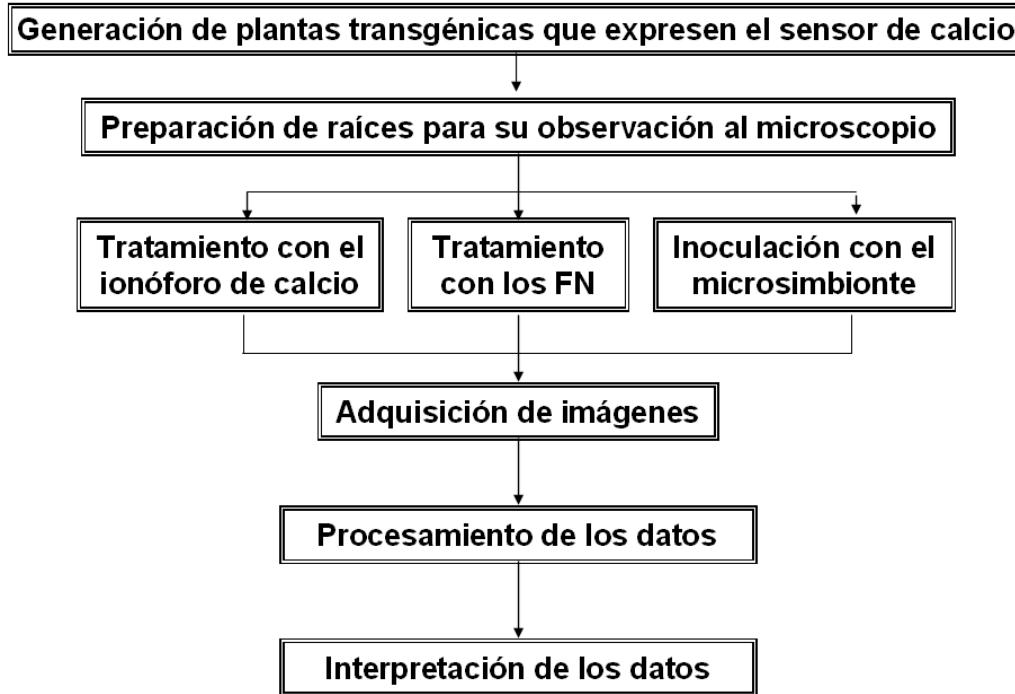
## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Caracterizar líneas transgénicas de *L. japonicus* y *P. vulgaris* que expresan la proteína Camaleón.
- Determinar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las diferentes etapas de desarrollo de los pelos radicales de las plantas transgénicas de *L. japonicus* y *P. vulgaris* que expresan la proteína camaleón.
- Cuantificar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático en los pelos radicales de las plantas transgénicas de *P. vulgaris* que expresan la proteína Camaleón incubados con los FNs de *R. etli* o inoculados con *R. tropici*.
- Determinar los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los pelos radicales de las plantas transgénicas de *P. vulgaris* que expresan la proteína Camaleón y que se encuentran en la etapa de formación de hilos de infección y en la etapa de formación de los primordios de nódulos.



## METODOLOGÍA.

### Esquema metodológico.



Desinfección y germinación de las semillas de *Lotus japonicus*. Las semillas de *L. japonicus* se escarificaron con lija, posteriormente se trataron con una solución de cloro al 2% y de Tween 20 al 0.02% durante 20 minutos. Después se lavaron 6 veces con agua miliQ estéril y se agregó agar al 0.15% y las semillas se guardaron a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las semillas se colocaron en cajas de Petri con medio B5 (20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20mM MgSO<sub>4</sub>, 490mM KNO<sub>3</sub>, 19mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.85mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.0105mM CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01mM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5.9mM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.103mM Na<sub>2</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.451mM KI, 0.695mM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8.12mM Ácido Nicotínico, 4.86mM Piridoxina-HCl, 28mM Tiamina-HCl, 0.07M CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>EDTA) sólido al 1.5% y se incubaron verticalmente de 5 a 10 días a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h sombra.

Desinfección y germinación de las semillas de *Phaseolus vulgaris*. Las semillas de *P. vulgaris* var. Negro Jamapa se lavaron con agua corriente. Después se trataron con una solución de Cloro al 20% durante 5 minutos, se lavaron dos veces con agua miliQ estéril y posteriormente se les agregó alcohol étílico industrial durante 1 minuto,

seguido de 4 lavados con agua miliQ estéril. Las semillas se germinaron en charolas metálicas previamente esterilizadas, sobre una cama de papel absorbente humedecido con medio Fahreaus (0.680 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.486 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.734 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.042 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18.5 μM Citrato férrico, 12 μM MnSO<sub>4</sub>, 765.1 μM ZnSO<sub>4</sub>, 46.25 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 320 μM CuSO<sub>4</sub>, 38.8 μM H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) estéril a pH 7 y se cubrió con papel aluminio. Finalmente se incubaron a 28 °C por 48 horas hasta su germinación.

Desinfección y germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*. Las semillas de *A. thaliana* o *N. benthamiana* se trataron con una solución de cloro al 60% y Tritón X-100 al 0.08% durante 10 minutos. Después se lavaron cuatro veces con agua miliQ estéril durante 10 minutos y se guardaron a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, las semillas se colocaron en cajas de Petri con medio MS (Murashige & Skoog Salt Mixture, Invitrogen) sólido al 1% de Phytigel y se incubaron verticalmente de 5 a 10 días a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h sombra.

Transformación de *Mesorhizobium loti* con el plásmido *DsRed*. Se utilizó la bacteria *Escherichia coli* cepa S17-1 que contiene el plásmido *DsRed*. Este plásmido tiene un gen de selección que le confiere resistencia al antibiótico tetraciclina. La transformación de *M. loti* cepa MAFF3030090 se realizó por el método de cruce biparental. La cepa de *E. coli* se cultivó en medio LB a 37 °C con agitación constante durante 24 h y la cepa de *M. loti* en medio PY a 30 °C con agitación constante durante 48 h. La conjugación se realizó incubando las dos cepas en contacto durante 12 h y finalmente, se seleccionaron las colonias que cumplieron con las condiciones de la conjugación.

Inoculación de plantas leguminosas con su microsimbionte. La cepa MAFF3030090 que ahora expresa el transgén *DsRed* se utilizó para inocular *L. japonicus* y la cepa CIAT899 de *R. tropici DsRed* para inocular *P. vulgaris*. Las cepas bacterianas se cultivaron en un medio con peptona de caseína (5 g/L) y extracto de levadura (3 g/L) adicionado con CaCl<sub>2</sub> 0.07 M. Para crecer y seleccionar la cepa MAFF3030090 *DsRed* se utilizó ácido nalidíxico (2 mg/100 ml) y tetraciclina (0.25 mg/100 ml) y para la cepa CIAT899 de *R. tropici DsRed*, ácido nalidíxico (2 mg/100 ml), rifampicina (2.5 mg/100 ml) y tetraciclina (1 mg/100 ml). El cultivo se incubó a 30 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.5 a 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. Las células del cultivo se lavaron dos veces y se resuspendieron en una solución que

únicamente contenía 10 mM MgSO<sub>2</sub>. Para la inoculación de las plantas, las bacterias tienen que estar a una OD<sub>600 nm</sub>=0.05. Las plantas que se encuentran creciendo en medio Fahraeus fueron inoculadas con sus simbiontes y se incubaron a 22 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h sombra y sacadas al momento de interés particular, es decir, cuando se encuentran recién inoculadas, cuando están formando los sitios de infección o cuando ya están noduladas.

Diseño de la construcción pK2GW7/YC3.60. A partir de la secuencia YC3.60 (número de acceso NCBI: AB178712), se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplificara a partir del plásmido, la región del Camaleón YC3.60 (Figura suplementaria B). La secuencia completa de YC3.60 se clonó en el vector pENTR/TOPO (Invitrogen), el cual es un vector de entrada Sistema Gateway, para movilizar de manera eficiente y rápida el gen de interés a un vector binario. La recombinación se realizó entre el vector pENTR/TOPO/YC3.60 y el vector binario pK2GW7, se transformó *E. coli*, y posteriormente se seleccionaron y se analizaron las colonias de las bacterias positivas para el crecimiento en el medio de selección adecuado. La recombinación se verificó por PCR de una región del plásmido resultante (pK2GW7/YC3.60), además se secuenció la construcción para corroborar y asegurar que la construcción de Camaleón se encontrara insertada en el plásmido destino.

Infiltración de *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens*. La cepa de *A. tumefaciens* con la construcción pK2GW7/YC3.60 se creció en medio líquido. Cuando el cultivo celular alcanzó una OD<sub>600nm</sub>=1, las células se recuperaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. La pastilla se resuspendió en 5 ml de 10 mM MgCl<sub>2</sub> y se agregaron 5 µl de acetosiringona 100 mM. Se incubó a temperatura ambiente durante 3 h. La suspensión celular se colocó en una jeringa (sin aguja) con la cual se inyectó la planta. En una hoja de una planta adulta de *N. benthamiana*, se presionó con la jeringa las hojas por la parte abaxial (Figura a) para introducirles o infiltrar la solución con las bacterias. Después de 48 h, se analizaron las células del epitelio de la parte abaxial de las hojas en el microscopio de fluorescencia para analizar la expresión del transgén Camaleón.



**Figura a.** Infiltración de hojas de *N. benthamiana*.

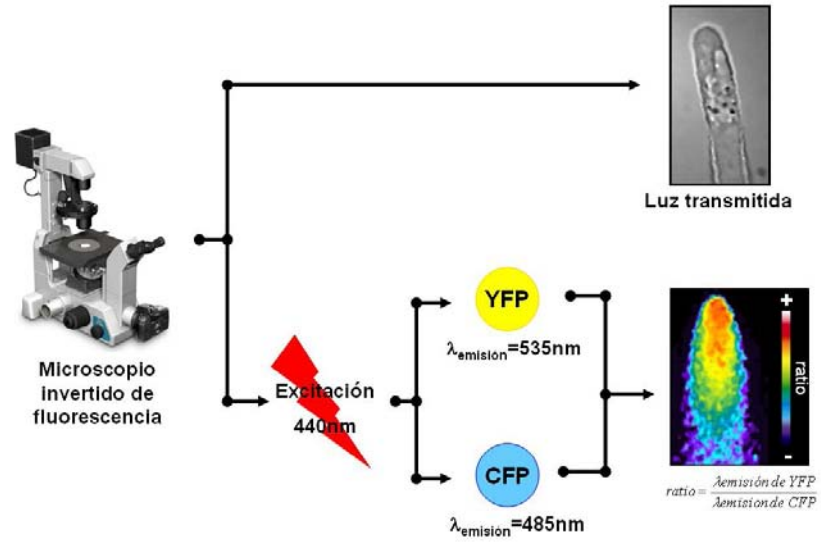
Transformación de *Phaseolus vulgaris* con *Agrobacterium rhizogenes*. Las plántulas de *P. vulgaris* de 3 días post germinación se inyectaron con *A. rhizogenes* K599 pK2GW7/YC3.60 en la parte inferior de los cotiledones (según Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). La planta inyectada se colocó en un tubo de vidrio con medio B&D y se incubó a 28 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h sombra. La generación de las raíces transgénicas (“hairy roots”) ocurre aproximadamente a los 10 días post inyección. Las plantas que generaron raíces transgénicas se procesaron cortando la raíz principal que no se encuentra transformada y manteniendo a las raíces transformadas o transgénicas en medio Fahraeus a una temperatura de 28 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h sombra.

Preparación de plántulas para su observación en el microscopio. Las raíces de plántulas transformadas con *A. rhizogenes* o las hojas transformadas con *A. tumefaciens* se colocaron en una caja Petri que contiene un orificio en el centro, a la cual se le ha fijado un cubreobjetos en su lugar. A esta cámara realizada de manera casera para este propósito se le adicionó medio de cultivo líquido y en el centro en donde se encuentra colocado el cubreobjetos se colocó la raíz o la hoja de la plántula con 1 ml del medio correspondiente estéril y se cubrió con una película de papel de celulosa (celofán dulce). Esta película de celofán ayuda a evitar el movimiento de la muestra en el medio líquido. Las muestras se incubaron a 22 o 28 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h sombra, y posteriormente se observaron al microscopio.

Adquisición de las imágenes. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron excitando a la muestra con una unidad externa de iluminación (DG-4, Sutter Instruments), con un

objetivo de inmersión en aceite (Nikon S Fluor 40X/1.30oil) o con un objetivo de inmersión en agua (Nikon 60X) y una apertura numérica de 1, esto de acuerdo a las necesidades del experimento. Las imágenes tanto de fluorescencia como de luz transmitida se capturaron utilizando una cámara de CCD (Cool SNAP HQ<sup>2</sup> Photometrics, Roper Scientific) y el programa especializado de captura de imágenes Metamorph y Metafluor (Universal Imaging), acoplado a un sistema de filtros giratorio (Lambda, Shutter Instruments), que controlan los filtros de emisión y de luz polarizada. También se cuenta con un obturador (Shuter Uniblitz) que permite el paso de la luz transmitida de manera automatizada. El sistema de microscopía consiste en un microscopio invertido marca Nikon (Eclipse TE 300) con óptica Nomarski.

Procesamiento de imágenes. Las imágenes que se obtuvieron a partir de la división de píxel por píxel de la longitud de onda del aceptor entre la del donador para mostrar la distribución real de proteína quimérica en la muestra analizada (Figura b) permitieron obtener un cociente, es decir que nos permitieron determinar de manera cuantitativa donde existe mayor concentración de calcio (en inglés, “Ratiometric”). Las imágenes obtenidas son procesadas usando las herramientas del programa de captura y procesamiento de imágenes Metamorph y/o Metafluor (Universal Imaging). A las imágenes de fluorescencia, se les sustrae el ruido de fondo (en inglés, “Background subtraction tool”) seleccionando un área de interés (ROI, por sus siglas en inglés) exterior al pelo radical, esta herramienta realiza una resta entre la intensidad de fluorescencia de la ROI y la intensidad de fluorescencia de toda la imagen. Para una mejor presentación de las imágenes de fluorescencia, se les aplica un filtro medio; este filtro toma un píxel de prueba y lo compara con los píxeles que lo rodean (kernel) y hace un promedio de las intensidades de fluorescencia. La fluorescencia se cuantifica seleccionando un área determinada de interés en la cual se mide la intensidad de fluorescencia promedio capturada y los datos se grafican con el software Excel (Microsoft).

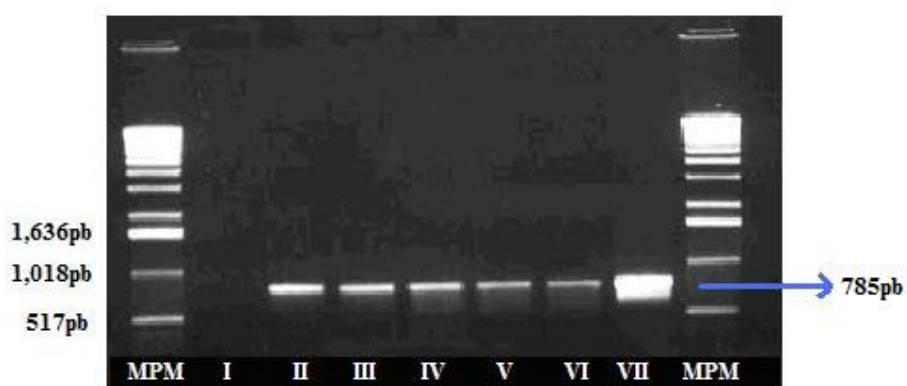


**Figura b.** Esquema de la adquisición y obtención de imágenes de las muestras analizadas para el estudio de los cambios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en plantas que expresan la proteína Camaleón.

## RESULTADOS.

### Generación de las líneas transgénicas estables de *Lotus japonicus* con la construcción de Camaleón versión 2.1.

A partir de plantas de *L. japonicus* que fueron transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* (At) y que contiene la construcción que codifica para Camaleón YC2.1 bajo el control del promotor constitutivo 35S (Allen *et al.*, 1999), se obtuvieron explantes que fueron transferidos a un medio de regeneración sólido que contiene kanamicina 100 mg/L (Km<sup>r</sup>) para seleccionar a las plantas transformadas. Posteriormente, los explantes se incubaron durante dos semanas y se repitieron los cambios de medio fresco durante 10 a 16 semanas. Finalmente, se obtuvieron los brotes Km<sup>r</sup>, los cuales se distinguen del control no transformado debido a que no crecen en la misma proporción. Se estimuló el enraizamiento de los brotes *in vitro* y se transfirieron a maceta para su adaptación en el invernadero. Las plantas resultantes se crecieron hasta formar flores y semillas; posteriormente, para corroborar que las plantas transformadas regeneradas portaban el transgén se procedió a amplificar un fragmento de 785pb que corresponde al gen NPTII (neomicina fosfotransferasa), el cual se encuentra presente en la construcción del vector. En la Figura 6 se observan los productos de PCR para las diferentes líneas transgénicas. De esta forma pudimos corroborar que molecularmente el transgén se encuentra insertado en el genoma vegetal de la planta de interés.



**Figura 6. Amplificación por PCR del fragmento de 785pb de las líneas de *L. japonicus* transformadas con Camaleón YC2.1.** Carriles: MPM) Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); I) Control Negativo, planta silvestre; II) Planta transgénica At114-1.1.5; III) Planta transgénica At114-1.3.3; IV) Planta transgénica At114-1.8.1; V) Planta transgénica At114-1.4-3; VI) Planta transgénica 114-1.4.3 y VII) Control positivo, plásmido que contiene a la construcción de Camaleón YC2.1.

## **Caracterización de las líneas transgénicas que expresan la proteína Camaleón.**

Las plantas de *L. japonicus* que cumplieron con las condiciones de regeneración en maceta, se crecieron hasta que generaron semillas. Las plantas adultas se analizaron por PCR para la presencia del transgén (Figura 6) y se seleccionaron las líneas de interés. Estas plantas se utilizaron para realizar una serie de observaciones por microscopía de fluorescencia y corroborar de manera directa la expresión de la proteína Camaleón. Para lograr este objetivo se realizó un ensayo que consiste en cortar una pequeña sección de la hoja de la planta para la visualización de los estomas en el microscopio.

Este enfoque nos permitió determinar que el transgén se está expresando y que puede monitorear los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  por un aumento significativo en los niveles de fluorescencia. Este experimento nos ofrece dos grandes ventajas; primero, que una pequeña porción de la hoja es suficiente para realizar el tamizado sin necesidad de sacrificar a la planta, y segundo, que las plantas pueden seguir creciendo y permitiendo que complete su ciclo de vida para la obtención de semillas.

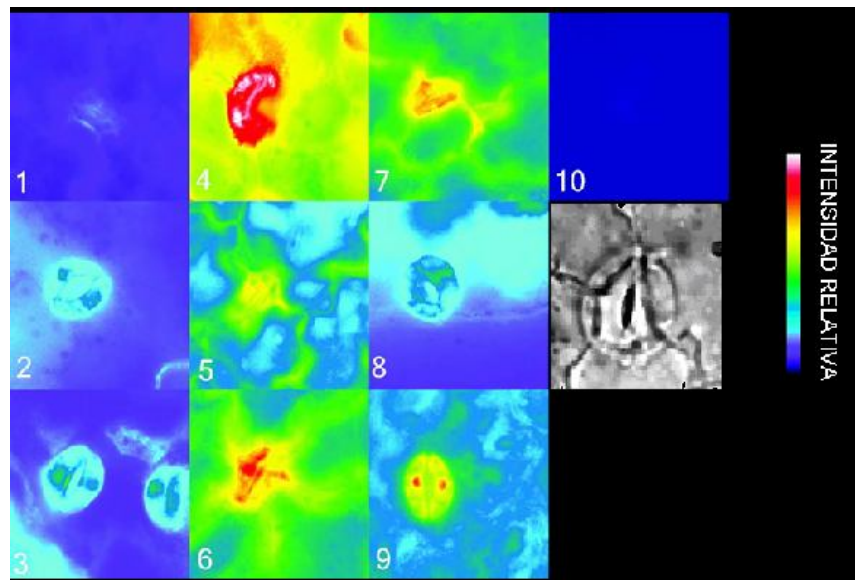
Una ventaja significativa de este método consiste en el hecho de seleccionar aquellas plantas que mantienen un nivel de expresión significativo para poder realizar las mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los datos obtenidos se observan en la Figura 7. Cada panel muestra la imagen de fluorescencia de estomas de las diferentes plantas analizadas, las cuales coinciden con las líneas positivas para el PCR en la Figura 6. Los estomas se observaron en un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 480 nm y se recuperó la señal en la longitud de onda de 530 nm. Este enfoque experimental nos permitió seleccionar a las líneas de *L. japonicus* que tenían los niveles óptimos de expresión, ya que se puede visualizar la señal sin ningún problema (panel 5, panel 6 y panel 7 de la Figura 7). Las plantas analizadas presentaron un crecimiento normal y desarrollo. Estos parámetros fueron importantes para seleccionar a las plantas que serán utilizadas para la determinación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares por medio de la técnica de FRET durante la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*.

En la Figura 7 también se puede observar (en el panel 10), una región de una hoja que muestra un estoma con su respectiva imagen de luz transmitida y la correspondiente imagen de fluorescencia. Esta imagen no presenta ninguna fluorescencia ya que ha sido



transformada con el vector vacío y por lo tanto no contiene el transgén de la sonda fluorescente.



**Figura 7. Estomas de hojas de *Lotus japonicus* transformadas con la construcción de Camaleón YC2.1.** Panel 1) Planta transgénica At114-1.1.5; 2) Planta transgénica At114-1.3.3; 3) Planta transgénica At114-1.8.1; 4) Planta transgénica At114-1.4.3; 5) Planta transgénica At114-1.1.1; 6) Planta transgénica At114-1.1.4; 7) Planta transgénica At114-1.1.7; 8) Planta transgénica At114-1.1.4; 9) Planta transgénica At114-1.4.2 y 10) Control Negativo (planta tipo silvestre), en el panel inferior se encuentra la imagen de luz transmitida correspondiente. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia con un tiempo de exposición de 20ms. La longitud de onda de excitación es 480nm y la longitud de onda de emisión es de 530nm. Los cambios de fluorescencia se representan por el gradiente de pseudocolor que va del rojo al violeta ubicado a la derecha de las imágenes.

### **Determinación de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular de los pelos radicales de las plantas transgénicas de *Lotus japonicus*.**

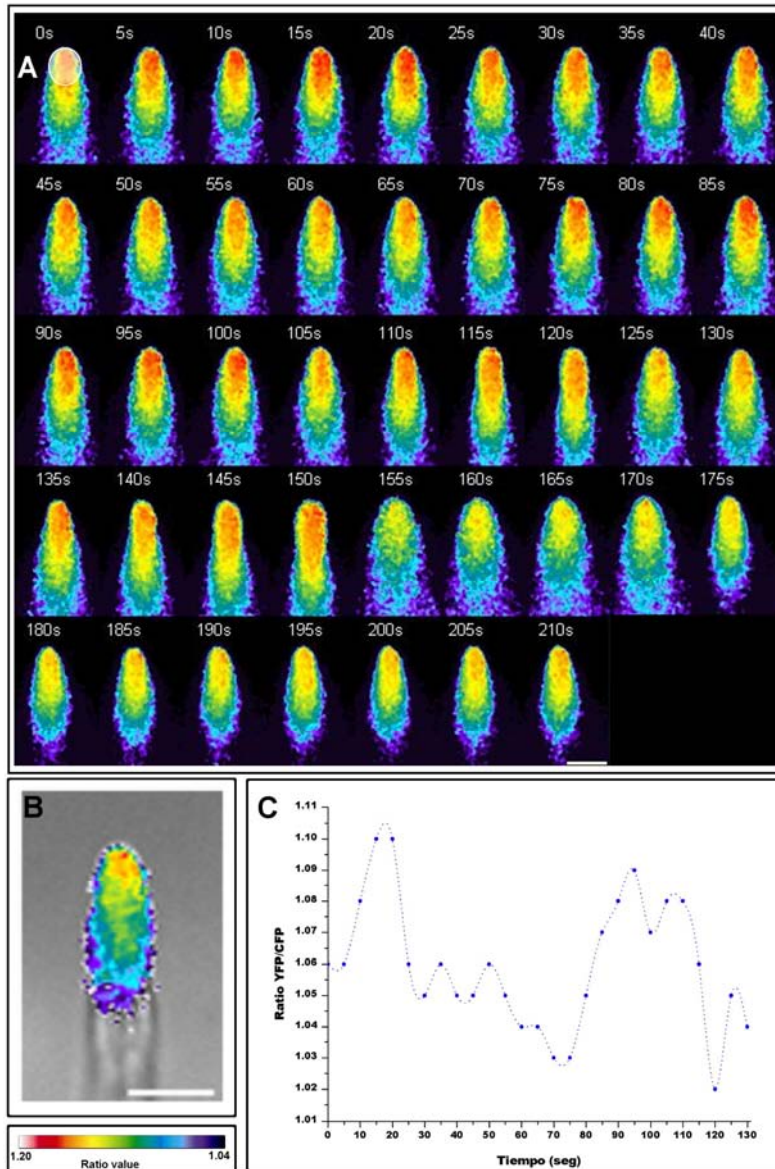
Las plantas de *L. japonicus* que contienen al transgén YC2.1 y que presentan una clara fluorescencia en las células de la superficie de la hoja (estomas), se seleccionaron para realizar la observación en los pelos radicales de las raíces de las plantas. Estas células son de nuestro particular interés porque es el sitio donde se lleva a cabo la interacción con *Rhizobium* y serán nuestro objeto de estudio. Es necesario que los pelos radicales se encuentren en la fase de crecimiento, ya que en esta etapa es cuando son más susceptibles de responder al *Rhizobium* o a sus moléculas señales, los factores Nod. Esta fase se caracteriza por presentar características morfológicas definidas como son la forma cilíndrica, recta, y uniforme del pelo así como abundante citoplasma acumulado

en la región apical. Esta alta acumulación de citoplasma en el ápice bajo condiciones de observación en tiempo real se define como un flujo citoplásmico lento en la región apical pero muy acentuado en la región subapical.

Los pelos radicales de las plantas transgénicas de *L. japonicus* fueron analizados por microscopía de fluorescencia para determinar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por medio de la técnica de FRET. Las plantas de *L. japonicus* que expresan YC2.1 se cultivaron sobre medio B5 sólido y después (6 a 8 días de germinación), se traspasaron a una cámara especial con medio líquido para su observación en el microscopio. Este cambio a medio líquido estresa temporalmente a los pelos radicales, por lo que es necesario que se recuperen durante aproximadamente 6 horas. Durante este tiempo los pelos radicales nuevamente reinician el crecimiento normal. Una vez recuperados, se observaron y analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 440nm para CFP y se recuperó la luz de emisión con un filtro que permite el paso de la luz a una longitud de onda de 488nm, esta es la emisión que no logra realizar FRET y también se colecta la emisión a 530nm, que corresponden a la longitud de onda de emisión YFP y por lo tanto la resultante del fenómeno de FRET. Este proceso es posible ya que el software “Metafluor” (Imaging Universal) tiene la capacidad de determinar el cociente de fluorescencia YFP(530 nm):CFP(488 nm). A partir de los datos recolectados, se pueden obtener secuencias de imágenes de la misma célula y observar casi en tiempo real como ocurren de los cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 8A).

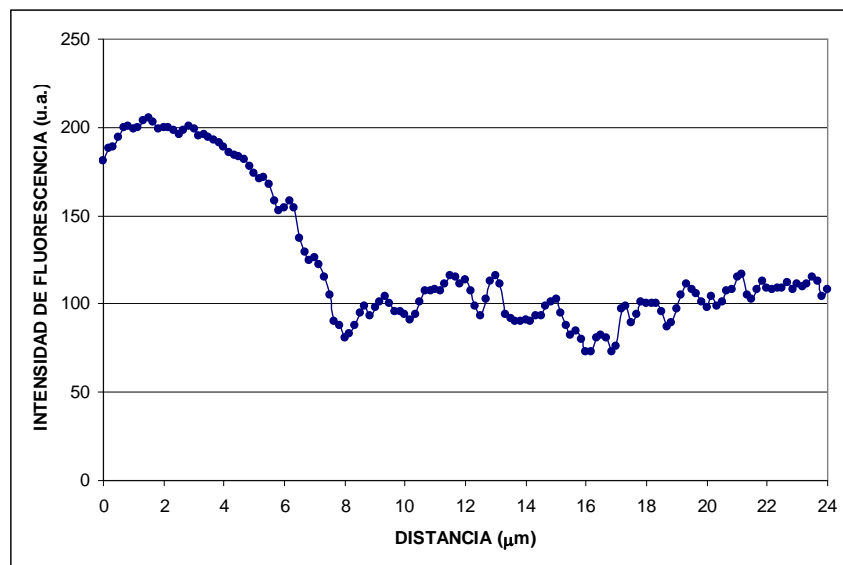
En la Figura 8 se observa una secuencia de imágenes de un pelo radical de una plántula de *L. japonicus* que expresa YC2.1, la cual presenta un discreto gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  apical que es más elevado hacia la región del ápice del pelo (Figura 8B), esta distribución del gradiente apical es típico de los pelos radicales que se encuentran en crecimiento. Además, es importante mencionar que la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los pelos radicales es de aproximadamente 200 nM y en el ápice ésta puede llegar de 500 a 1000 nM, por lo que el rango dinámico de la proteína YC2.1 nos permitió visualizar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula viva que ha sido transformada con la sonda molecular Camaleón. Además, todas las células en crecimiento mantienen esta distribución apical de  $\text{Ca}^{2+}$  a diferencia de las que no se encuentran creciendo, que no presentan este gradiente, por lo que podemos concluir que el mantenimiento de un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta esencial para el mantenimiento del crecimiento en estas células polarizadas.

La posibilidad de nuestro sistema de microscopía para realizar la adquisición de imágenes de los pelos radicales en un tiempo corto nos permite obtener información importante sobre cómo cambian los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares durante el crecimiento de un pelo radical joven y en crecimiento. Para esto, nuestro software cuenta con la posibilidad de determinar una región de interés (círculo sombreado, Figura 8A) para extraer los datos y de esta manera graficar (Figura 8C) los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo del tiempo y el estado de desarrollo del pelo radical. Estos datos dan información importante, como la capacidad de analizar que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  no se mantienen constantes, sino que se modifican a lo largo del tiempo y reflejan en gran medida los eventos fisiológicos que la célula experimenta durante su crecimiento. Cuando se realizan estudios más detallados de los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  con las velocidades de crecimiento del pelo radical, se sabe que estos están relacionados con la velocidad de crecimiento de la célula. En general el aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  están asociados con un pulso de crecimiento rápido, mientras que la disminución de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  se relacionan con un retraso en la velocidad de crecimiento. Existen otros factores que también contribuyen a una disminución de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y este puede ser la edad del pelo radical, ya que las células que han llegado a la madurez en todas las ocasiones disipan este gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y detienen su crecimiento (datos no mostrados).



**Figura 8. Niveles de calcio intracelular en el pelo radical de *Lotus japonicus*.** A) Secuencia de imágenes de fluorescencia durante el crecimiento del pelo radical de raíces de plantas transgénicas de *L. japonicus* que expresan el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (YC2.1). B) Representación de la fluorescencia del ratio YFP/CFP sobre la imagen de luz transmitida del pelo radical. C) Representación gráfica de los cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la región apical del pelo radical (zona sombreada en el pelo radical del tiempo cero, panel A). Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de pseudocolor que va del rojo al violeta mostrado en el panel inferior izquierdo. Escala  $10\mu\text{m}$ .

La localización de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo del pelo radical en crecimiento es mayor en la región apical y disminuye hacia la base del pelo. Esto se puede analizar fácilmente al seleccionar una región trazando una línea y posicionarla desde el ápice del pelo radical hasta su base. Estos datos se representan en la gráfica de la Figura 9 en donde los datos a lo largo de la línea de interés muestran los niveles de fluorescencia y por lo tanto, la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo del pelo radical. Estos resultados nos permiten determinar que la mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se encuentra en la región apical y este disminuye gradualmente hacia la base hasta alcanzar los niveles basales del resto del citoplasma.



**Figura 9. Distribución del calcio intracelular a lo largo de un pelo radical.** Los datos se obtuvieron a partir del ratio YFP/CFP de la imagen 0s que se muestra en el panel A de la Figura 8; para lo cual se trazó una línea desde el ápice hasta la base del pelo radical y se graficó la intensidad de fluorescencia a lo largo de ésta. En la gráfica se observa que los valores más altos de ratio se encuentran en la región apical, en los primeros 5  $\mu\text{m}$  y disminuyen hasta alcanzar un nivel basal después de 10  $\mu\text{m}$  hacia la base del pelo radical.

### **Determinación de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ citoplasmático de los pelos radicales tratados con el ionóforo de $\text{Ca}^{2+}$ (Ionomicina).**

Dado que una de las respuestas tempranas en la interacción rhizobia con leguminosas es el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se utilizó la ionomicina (ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ ) para simular esta respuesta y a su vez, confirmar que Camaleón es sensible a los cambios en

la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  durante esta respuesta. Para lo cual se utilizaron pelos radicales de *L. japonicus* que expresan a la proteína Camaleón; posteriormente se les aplicó la ionomicina a una concentración final de 10  $\mu\text{m}$  (Figura suplementaria A). En la gráfica se observa un pequeño aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ápice de los pelos radicales después de la adición del ionóforo. Las células analizadas no presentan una respuesta típica a la adición de un ionóforo, es decir los niveles en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  no llegan a restablecerse. Por lo tanto, se analizaron diferentes concentraciones de ionomicina para determinar si podría ser un factor determinante y el resultado fue similar (datos no mostrados). De esta manera descartamos la posibilidad de utilizar ionomicina como una droga capaz de aumentar la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los pelos radicales y dado que determinar las causas no era el objeto de nuestro interés, se utilizó otro ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  que describiremos más adelante. Sin embargo, resulta relevante mencionar que un ionóforo tan utilizado y confiable en células animales no mantiene los mismos efectos en las células vegetales analizadas en este trabajo. Este dato resulta importante considerar en experimentos posteriores.

#### **Determinación de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ citoplasmático de los pelos radicales inoculados con *Mesorhizobium loti*.**

La interacción de las bacterias del género *Rhizobium* con las plantas leguminosas es necesaria para la fijación biológica del nitrógeno, es por ello, que uno de nuestros objetivos es la cuantificación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la interacción de la bacteria con la raíz de *Lotus* que expresa el transgén capaz de censar  $\text{Ca}^{2+}$ . Para ello, primero fue necesario analizar si las líneas transgénicas de *L. japonicus* eran capaces de nodular al ser inoculadas con *Mesorhizobium loti*, su microsimbionte, con la finalidad de descartar que las plantas transgénicas estén alteradas en el proceso simbiótico durante la transformación de las plantas con *Agrobacterium*.

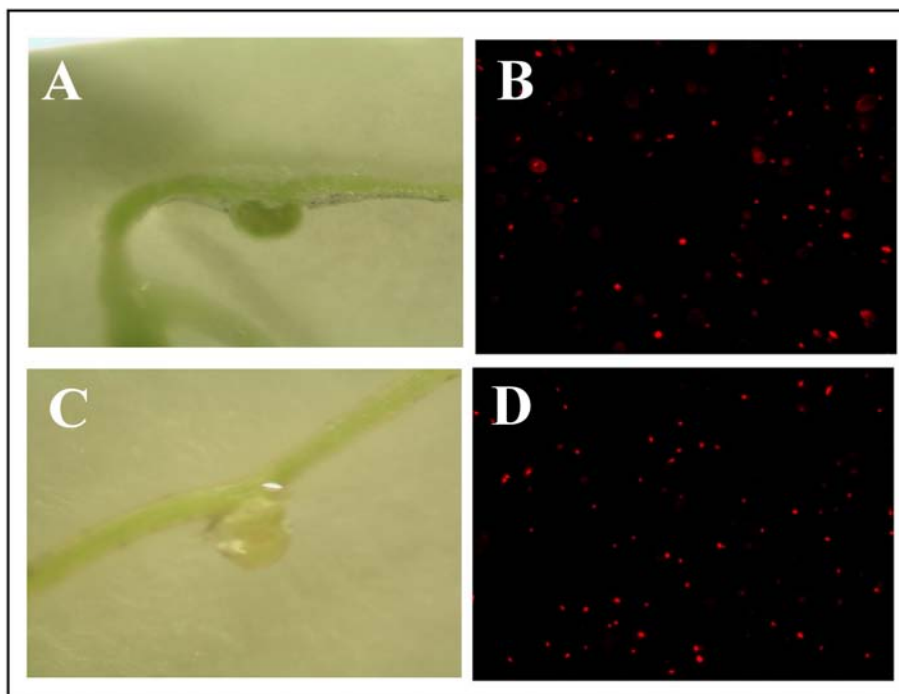
La bacteria *M. loti* se transformó con el plásmido *DsRed* y las colonias seleccionadas con el antibiótico adecuado se analizaron por microscopía de fluorescencia, excitando a una longitud de onda 555 nm y recuperando la señal de emisión a una longitud de onda de 605 nm. Este procedimiento hizo posible visualizar a *Rhizobium* eficientemente. La obtención de la cepa fluorescente, la cual de aquí en adelante se llamará *M. loti DsRed*, nos permitirá en un futuro seguir el proceso de la infección de rhizobia en la planta leguminosa; en particular, durante la formación del hilo de infección. Otra de las

características importantes, es que las longitudes de onda de excitación y emisión de *DsRed* en la bacteria y Camaleón en la planta se encuentran en un rango diferente, por lo tanto no representan ningún problema para su observación simultánea y no ocasionarán interferencia en la obtención de ambas señales fluorescentes.

Para llevar a cabo la inoculación, se germinaron las semillas de *L. japonicus*, al quinto día se cambiaron a tubos para crecerlos en medio hidropónico. Posteriormente, se cultivaron durante cinco días para permitir su recuperación, al sexto día se inocularon con 1ml de la cepa *M. loti DsRed* para visualizarla por fluorescencia, la cual se cultivó previamente durante 2 días en un medio adecuado (ver metodología) y al doceavo día se realizó una segunda inoculación. Este enfoque nos permitió saber si las líneas transgénicas de *L. japonicus* son capaces de llevar a cabo la simbiosis para la formación de los nódulos fijadores de nitrógeno.

En la Figura 10 (panel A y C) se muestran imágenes de nódulos de 30 días post-inoculación, tanto de una línea transgénica como de una planta silvestre de *L. japonicus*. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que tanto los nódulos de la planta silvestre como de la transgénica tienen una apariencia normal, lo cual indica que visiblemente las plantas no están afectadas en el proceso de la nodulación. La coloración verde no es una diferencia fenotípica, ya que debido al sistema de nodulación hidropónico, después de cierto tiempo y de estar en contacto con la luz tienden a virar al verde, independientemente de si es silvestre o transgénica.

Los nódulos que se generaron en las raíces tanto silvestre o transgénicas, se cortaron, se maceraron y su contenido fue observado por microscopía de fluorescencia para corroborar la presencia de la bacteria *M. loti DsRed* y descartar que fueran nódulos vacíos (Figura 10, panel B y D) o inducidos con otra cepa bacteriana como resultado de una contaminación. Sin embargo, los datos obtenidos demuestran que la cepa *M. loti DsRed* fue la responsable de la nodulación en las plantas de *L. japonicus* que expresan el transgén Camaleón y que este hecho no presenta ningún problema para infectar la planta transgénica Camaleón.



**Figura 10. Nódulos de *L. japonicus* de 30 días post-inoculación con *M. loti* DsRed.** Panel A, raíz transgénica de *L. japonicus* que expresa el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  (YC2.1), panel C, planta silvestre de *L. japonicus*; panel B y D, imágenes de fluorescencia de bacterias obtenidas a partir de los nódulos del panel A y C, respectivamente.

Finalmente, con la estandarización de las condiciones para la inoculación y nodulación de las plantas silvestres y transgénicas, se realizó la identificación de las líneas transgénicas de *L. japonicus* que son capaces de llevar a cabo el proceso de infección, se cultivaron cuidadosamente en condiciones de invernadero y finalmente se seleccionaron las semillas que provienen de las plantas que mostraron fluorescencia debido a la expresión del transgén Camaleón. Estas semillas se germinaron y el crecimiento de las plántulas se continuó en macetas, con la finalidad de tener la segunda generación para realizar posteriormente retrocruzas y generar plantas que sean homocigotas para la expresión de la proteína Camaleón.



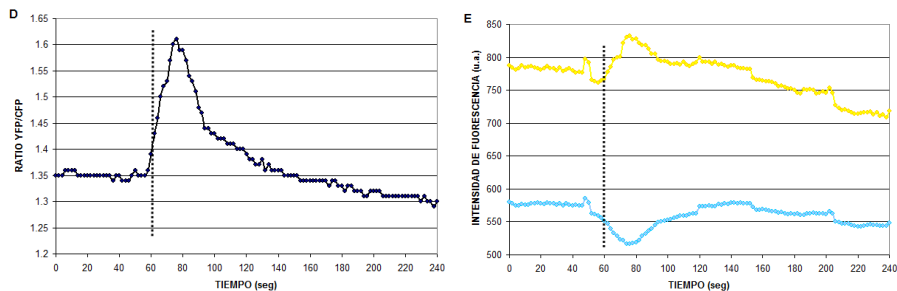
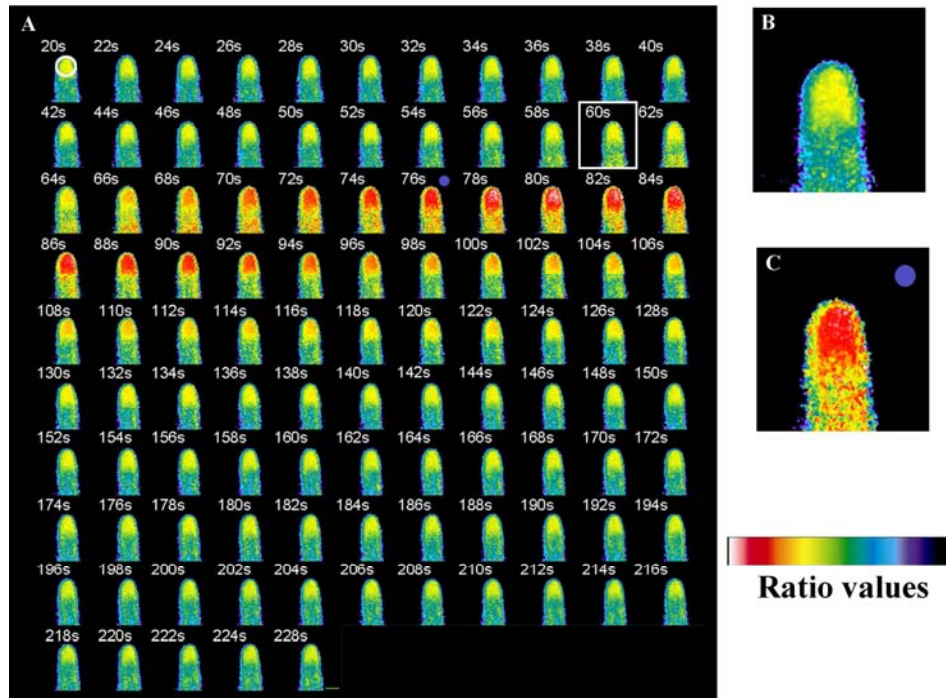
**Determinación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los pelos radicales de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan una nueva versión de Camaleón (YC3.60).**

Estudios previos en plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan la proteína Camaleón 3.60 (YC3.60) han permitido determinar que la proteína fluorescente es capaz de percibir cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático en pelos radicales vivos (Monshausen 2008). La versión 3.60 del Camaleón permite tener una buena intensidad de fluorescencia y la proteína es más estable a los cambios de pH de la célula respecto a la versión 2.1 de Camaleón. El laboratorio del Dr. Simon Gilroy amablemente nos donó semillas de la línea transgénica de Camaleón 3.60 de *A. thaliana*, las cuales se utilizaron como control positivo para el estudio del cambio en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en los pelos radicales vivos en presencia de un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (drogas q).

Los pelos radicales de las plantas transgénicas de *A. thaliana* fueron analizados por microscopía de fluorescencia para determinar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por medio de la técnica de FRET. Las plantas de *A. thaliana* que expresan YC3.60 se cultivaron sobre medio MS sólido y después de 6 a 8 días de germinación, se traspasaron a una cámara especial para su observación en el microscopio. Una vez recuperados, se procedió a su observación en el microscopio de fluorescencia en donde se utiliza una longitud de onda de excitación de 440nm y se recupera la luz de excitación con el filtro de 488 y 530nm, que corresponden a la longitud de onda de emisión de CFP y YFP, respectivamente. De manera general la emisión en 488 nm corresponde a la emisión de CFP que no experimenta FRET y la de 530 nm a la emisión dependiente de FRET. Por lo tanto de las condiciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos estudios nos permitieron visualizar la distribución de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los pelos radicales de *Arabidopsis* en la región apical (Figura 11B).

Las plantas de *A. thaliana* con la construcción YC3.60 fueron tratadas con diferentes concentraciones del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  denominado A23187 (Monshausen *et al.*, 2008), siendo la concentración de 10 $\mu\text{M}$  de A23187 la que mejor funcionó para observar el incremento en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 11A), el cual es mas evidente en la región apical del pelo radical. En la Figura 11B y 11C, el cambio de amarillo a rojo indica el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , como resultado de la aplicación del ionóforo. Los

datos de esta gráfica se obtuvieron a partir de una región del ápice del pelo (circunferencia blanca que denota la región de interés en la Figura 11A) donde los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  son mas evidentes después de la aplicación del ionóforo A23187; minutos después de la aplicación se puede observar que el pelo recupera las condiciones iniciales (Figura 11D). Este hecho es una respuesta esperada, ya que la célula tiene que compensar el aumento en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya sea capturando el  $\text{Ca}^{2+}$  en los compartimentos intracelulares o movilizándolo el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de proteínas que participan en su regulación. También se tiene que considerar que el experimento es el resultado de una aplicación local del ionóforo en el pelo radical, el cual se distribuye inmediatamente al resto del medio, disminuyendo su concentración y por lo tanto su efectividad. La respuesta al ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  de los pelos radicales de *A. thaliana* que expresan a la YC3.60 fue determinante para reconsiderar algunos de nuestros experimentos a corto plazo, ya que como se mencionó anteriormente, la ionomicina no funcionó como un agonista capaz de inducir un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en los pelos radicales y el ionóforo A23187 generó mejores resultados.



**Figura 11. Niveles de calcio intracelular en un pelo radical de *Arabidopsis thaliana* después de la aplicación del ionóforo para calcio A23187.** A) Secuencia de imágenes de fluorescencia durante el crecimiento de un pelo radical de raíces de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (YC3.60) en respuesta al ionóforo (cuadro blanco). B-C) Representación de la fluorescencia del ratio YFP/CFP antes (panel B) y después de la aplicación del ionóforo (panel C, el círculo azul indica la imagen que se utilizó de la secuencia de imágenes en panel A, como puede observarse el cambio de color indica el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región apical del pelo. Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de la escala de pseudocolor que va del rojo al violeta ubicado en la parte inferior de la imagen C. Rojo es mayor concentración y violeta menor concentración. D) Representación gráfica de los cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una región específica (circunferencia blanca indicada en el pelo radical del tiempo 0s, panel A). La línea punteada indica la aplicación del ionóforo. E) Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia de CFP (trazo azul) y YFP (trazo amarillo) después de la aplicación de A23187 (línea punteada); los datos obtenidos en la gráfica se utilizaron para realizar el ratio en el panel D. Escala  $10\mu\text{m}$ .

Inicialmente se diseñaron experimentos que nos permitieran utilizar las plantas de *L. japonicus* que expresan YC2.1, las cuales requieren de un tiempo mas largo para realizar las retrocruzas y obtener las plantas homocigotas. Como se mencionó, el inconveniente de tener plantas heterocigotas es que varias líneas no resultan fluorescentes y en algunas ocasiones los niveles de fluorescencia no son lo suficientemente claros. Sin duda alguna, la principal limitante de esta estrategia es la acumulación adecuada de Camaleón en los pelos radicales debido a que es mayor conforme los pelos radicales se acercan a la madurez.

Por lo tanto, se decidió considerar la utilización de la versión YC3.60 del Camaleón, la cual ha sido empleada en *Arabidopsis* y que hemos corroborado su funcionalidad con la finalidad de generar una construcción que se pudiera utilizar en plantas compuestas no solo de *Lotus*, sino también de frijol. Para esto se realizaron las construcciones correspondientes para introducirlas a *A. rhizogenes* y expresarlas en *P. vulgaris* (frijol), una planta modelo utilizada en nuestro laboratorio para el estudio de la simbiosis con *Rhizobium*.

Recientemente en el laboratorio se ha realizado la transformación genética de frijol mediante la infección con *A. rhizogenes*, lo cual genera plantas compuestas, es decir, solamente la raíz esta transformada y no el resto de la planta. Por lo tanto, hicimos uso de la generación de plantas compuestas para introducir nuestras construcciones que codifican para los sensores de  $Ca^{2+}$  de interés. Con este enfoque se logró generar raíces transgénicas y estudiamos los cambios en la concentración de  $Ca^{2+}$  durante el proceso simbiótico. Los experimentos se describen en la siguiente sección.

### **Diseño de la construcción YC3.60.**

Debido a que los pelos radicales de la línea transgénica de *A. thaliana* se comportaban de la misma forma a lo reportado en la literatura y dado que la proteína YC3.60 es más estable y presenta un mayor rango dinámico para la determinación de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , decidimos utilizar la construcción YC3.60 para generar plantas compuestas de frijol y acelerar nuestros objetivos en tanto se regeneran las plantas de *Lotus* transformadas de manera estable.

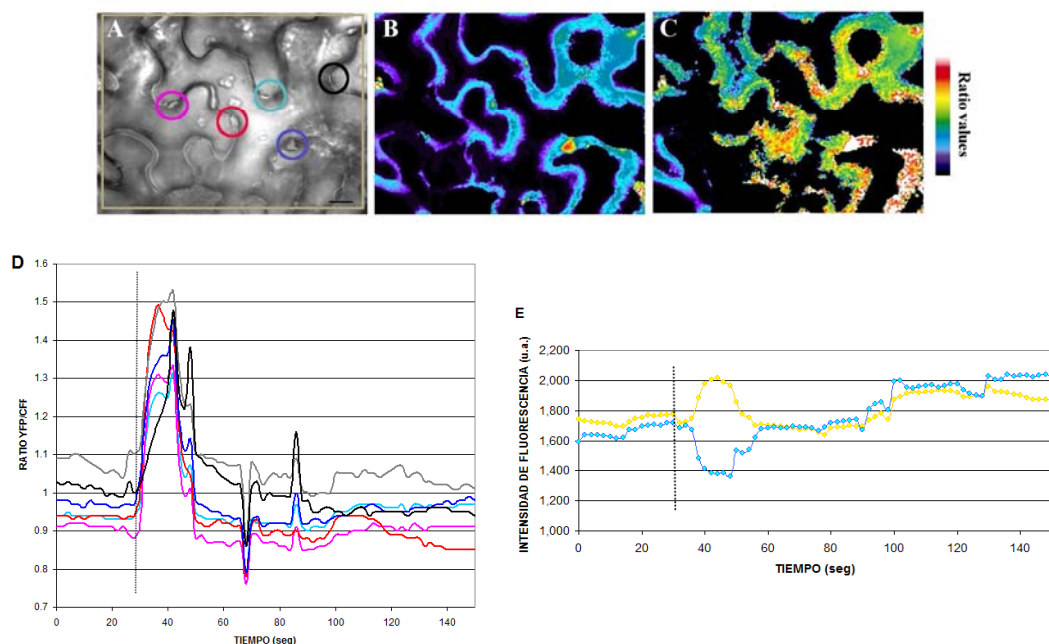
El plásmido resultante se denominó pK2GW7/YC3.60 (Figura suplementaria B). Una vez generada la construcción de transformación esta fue incluida en las cepas de *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens* con el fin de transformar las plantas de frijol y de tabaco, respectivamente (ver metodología). A continuación se describen los experimentos realizados para este objeto.

### **Determinación de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular de las hojas transgénicas de *Nicotiana benthamiana*.**

Para verificar que la construcción YC3.60 en el vector binario funcionara de manera adecuada, se utilizó el método de agroinfiltración para inducir la expresión del gen de interés en hojas de *N. benthamiana*. De esta manera, evaluamos su expresión y su localización en el citoplasma en un plazo de 48 a 72 hrs. Esta estrategia se utilizó porque la transformación genética mediante infiltración es un método más rápido y conveniente comparado con la generación de plantas compuestas, que requiere de por lo menos dos semanas de trabajo. El objetivo final del diseño de la construcción YC3.60 es la generación de plantas compuestas de *P. vulgaris* y resulta conveniente asegurarse que la construcción no tiene ningún problema para su expresión en células vegetales. Para llevar a cabo la agroinfiltración, se transformaron células de *A. tumefaciens* con la construcción pK2GW7/YC3.60, se crecieron y se resuspendieron en un buffer de solución. Las hojas de la planta adulta de *N. benthamiana* se inyectaron con la solución (ver procedimiento en metodología) y después de 48 horas se analizaron las células del epitelio de la parte abaxial de las hojas en el microscopio de fluorescencia para determinar la expresión de Camaleón.

En la Figura 12, las imágenes muestran la localización de la fluorescencia en el citoplasma, indicando que la proteína se está expresando adecuadamente (Figura 12B). Dado que el Camaleón es un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , se analizó si era capaz de responder a los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , para lo cual se utilizó el ionóforo A23187. En la Figura 12C, se observa el aumento de fluorescencia a la par del aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  después de la aplicación de 1mM del ionóforo, corroborando la eficiencia de la nueva versión de Camaleón al responder a cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  así como la recuperación de la célula a la condición basal (Figura 12D). En la

gráfica de la Figura 12D se observan diferentes regiones analizadas de las células del epitelio de la parte abaxial de las hojas de la plántula (Figura 12A), las cuales muestran que el ionóforo tiene un efecto sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en todas las células analizadas y se comportan de manera similar.



**Figura 12. Niveles de calcio intracelular en células epiteliales de *Nicotiana benthamiana* que expresan la proteína YC3.60 después de la aplicación de A23187.** A) Representación gráfica de la imagen de luz transmitida, los círculos de colores así como el rectángulo (selección de todo el campo), muestran las regiones que se utilizaron para obtener los datos de cambio en ratio y por lo tanto de concentraciones de calcio y que se muestran en la gráfica del panel D. B-C) Representación de la fluorescencia de células epiteliales de plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (YC3.60) antes (panel B) y a los 6seg después de la aplicación del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (panel C). Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de pseudocolor que va del rojo al violeta ubicado a la derecha de las imágenes. D) Representación gráfica de los cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de las diferentes regiones del panel A de las células epidérmicas de *N. benthamiana*. La línea punteada negra indica la aplicación del ionóforo. E) Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia de CFP (trazo azul) y YFP (trazo amarillo) después de la aplicación de A23187 (línea punteada); los datos obtenidos en la gráfica se utilizaron para realizar el ratio de la gráfica D correspondiente al trazo azul rey. Escala 10 $\mu\text{m}$ .

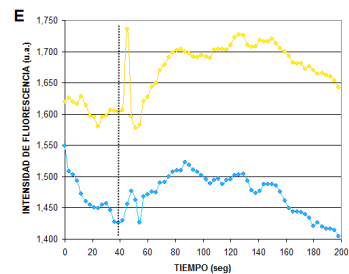
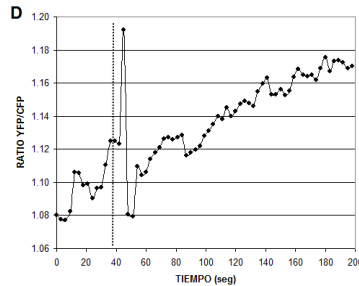
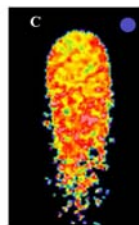
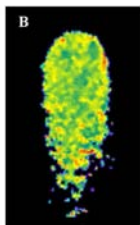
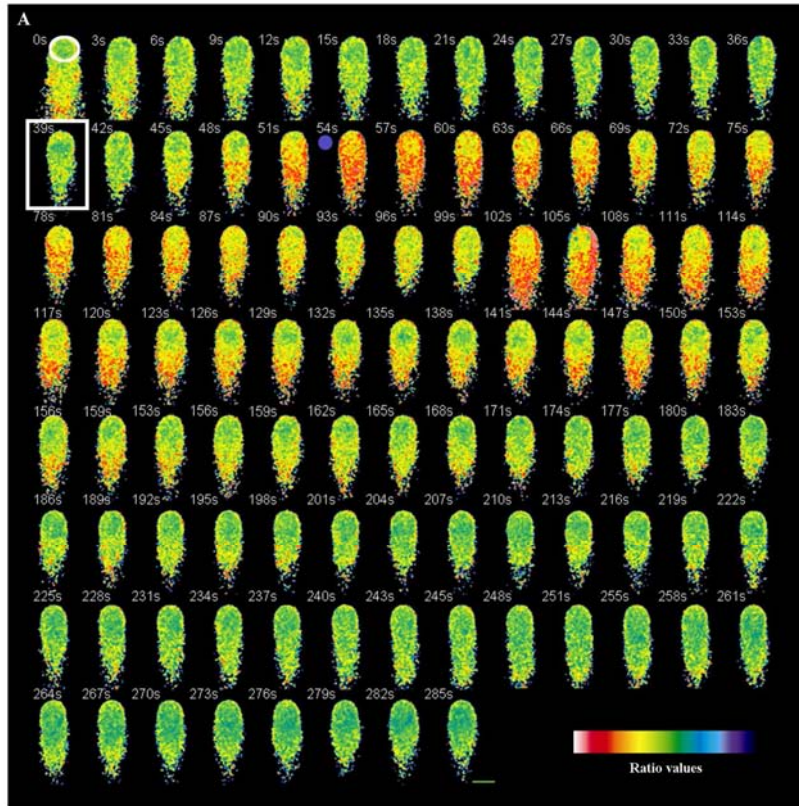
### **Determinación de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en los pelos radicales de las plantas compuestas de *Phaseolus vulgaris* en respuesta a los FN y a la inoculación con *Rhizobium*.**

Se generaron las plantas compuestas con las raíces pilosas que expresan el transgén YC3.60 (ver metodología). La planta compuesta se cultivó en medio Fahraeus líquido y

se incubaron a 30 °C para permitir la regeneración y recuperación de los pelos radicales de las raíces pilosas. A los 2 días, se disectaron las raíces para su observación en el microscopio y se constató que. Efectivamente, varias de las raíces pilosas resultaron fluorescentes sin afectar el crecimiento normal de los pelos radicales. Posteriormente se trataron con los factores de nodulación (FN) o bien se inocularon previamente con *Rhizobium*, lo cual se describirá en la siguiente sección.

#### **Tratamiento con los factores de nodulación (FNs).**

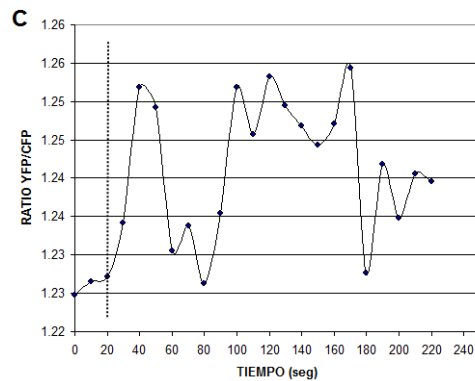
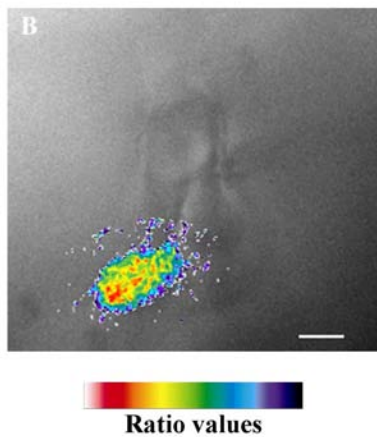
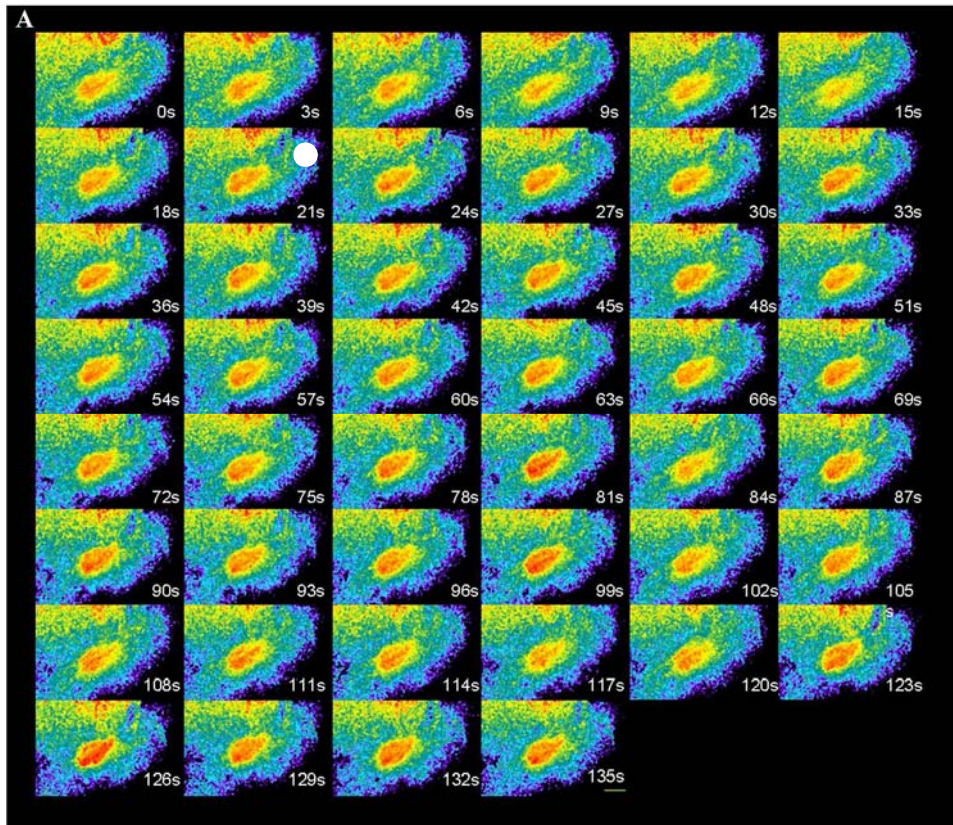
Una de las respuestas tempranas en la percepción de los FNs, es el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ápice del pelo radical y en la zona perinuclear, lo cual ya ha sido previamente reportado (Cárdenas 1999). Por esta razón, a partir de plantas compuestas de *P. vulgaris*, se disectaron las raíces pilosas para analizar en el microscopio los pelos radicales fluorescentes, como indicador de la expresión del transgén sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las raíces que presentaban pelos radicales fluorescentes y además, condiciones normales de crecimiento, se seleccionaron y fueron tratados con los FNs. En la Figura 13A, se muestra la secuencia de imágenes de un pelo radical tratado con  $10^{-8}\text{M}$  de los FNs (recuadro blanco) y segundos después se observa el aumento en la concentración de calcio en la región del ápice del pelo, lo cual es mas evidente en la gráfica (Figura 13D), estos resultados coinciden con el aumento del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  reportado previamente en nuestro laboratorio y por otros grupos de trabajo.



**Figura 13. Niveles de calcio intracelular en un pelo radical de *P. vulgaris* después de la aplicación de los FNs.** A) Secuencia de imágenes de fluorescencia durante el crecimiento del pelo radical de raíces de plantas transgénicas de *P. vulgaris* que expresan el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (YC3.60) en respuesta a los FN  $10^{-8}\text{M}$  (cuadro blanco). Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de pseudocolor que va del violeta al rojo ubicado en la parte inferior de la secuencia de imágenes. B) Imagen de fluorescencia de la relación YFP/CFP antes de la aplicación de los FNs. C) Representación de la fluorescencia de la relación YFP/CFP después de la aplicación de los FNs, como puede observarse el cambio de color, es indicativo del aumento en los valores de ratio y por lo tanto en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . El punto azul indica la imagen correspondiente en el panel A que se utilizó para ilustrar los cambios. D) Representación gráfica de los cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la región apical del pelo radical (circunferencia blanca en el pelo radical del tiempo cero, panel A). La línea punteada indica la aplicación de los FNs. E) Representación gráfica de los cambios en la fluorescencia de CFP (trazo azul) y YFP (trazo amarillo) después de la aplicación de los FNs (línea punteada); los datos obtenidos en la gráfica se utilizaron para realizar el ratio en panel D. Escala  $10\mu\text{m}$ .



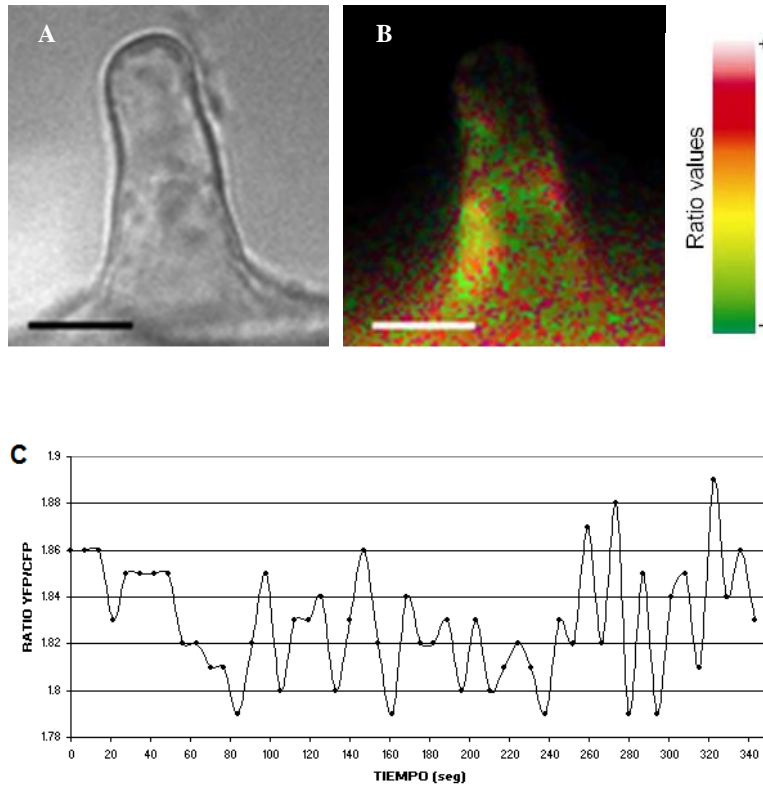
También se analizó la región cercana al núcleo (perinuclear), porque en estudios realizados en nuestro laboratorio (Cárdenas *et al.* 1999) se ha reportó que en pelos radicales de *P. vulgaris* después de la aplicación de los FNs, se observan cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región perinuclear. En la gráfica de la Figura 14, se observan cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  perinuclear después de la aplicación de los FNs; en la secuencia de imágenes se indica la aplicación de  $10^{-8}\text{M}$  de los FNs (círculo blanco). La variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es la esperada, porque la respuesta durante el tiempo ocurre después del influjo inicial del  $\text{Ca}^{2+}$  observado en el ápice (Figura 13).



**Figura 14. Niveles de calcio intracelular en la región perinuclear de un pelo radical de *Phaseolus vulgaris* después de la aplicación de los factores de nodulación.** A) Secuencia de imágenes de fluorescencia durante el crecimiento de un pelo radical de raíces de plantas transgénicas de *P. vulgaris* que expresan el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (YC3.60) en respuesta a los FN  $10^{-8}\text{M}$  (círculo blanco). B) Representación de la fluorescencia en valores de (ratio) YFP/CFP sobrepuesta a la imagen de luz transmitida del pelo radical. Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de pseudocolor que va del violeta al rojo ubicado en la parte inferior de la secuencia de imágenes. C) Representación gráfica de los cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la región nuclear del pelo radical. Escala  $10\mu\text{m}$ .

### **Inoculación con *Rhizobium tropici* (DsRed).**

Las plantas compuestas de *P. vulgaris* que expresan la construcción YC3.60 se inocularon con *R. tropici* (DsRed) para observar por fluorescencia tanto la presencia de la bacteria como la señal del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante la sonda molecular Camaleón. La identificación de la bacteria mediante fluorescencia es importante para visualizar los sitios en donde se están formando los hilos de infección y de esta manera hacer la búsqueda más eficiente. Esto se logra mediante la localización de la señal de fluorescencia de las bacterias que expresan a la proteína DsRed. Para lograr nuestro propósito, las plantas fueron inoculadas con la cepa CIAT899 DsRed de *R. tropici* a una densidad óptica (600nm) de 0.05. Dos días después de la inoculación, se analizó la respuesta del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la región perinuclear de los pelos radicales (Figura 15). En la Figura 15, se observa que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región perinuclear es intensa y varía conforme transcurre el tiempo (Figura 15C), el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  era predecible debido a que tanto los FNs como las bacterias tienen el mismo efecto sobre la región perinuclear de los pelos radicales susceptibles de ser infectados.



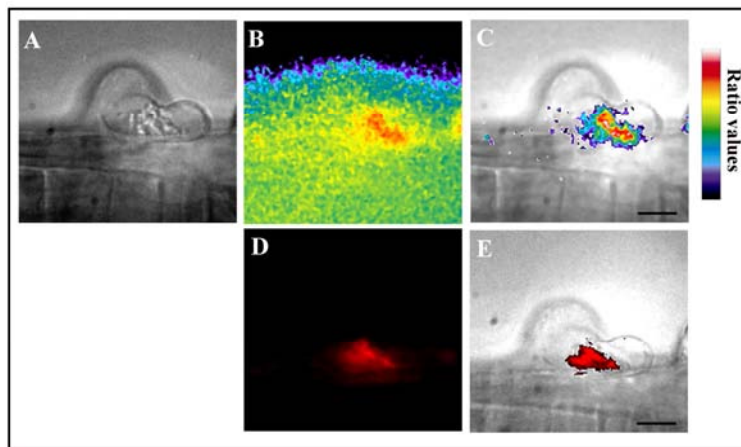
**Figura 15. Niveles de calcio intracelular en la región nuclear en un pelo radical de *Phaseolus vulgaris* después de la inoculación con *Rhizobium tropici* DsRed.** A) Imagen de luz transmitida de un pelo radical de raíces de plantas compuestas de *P. vulgaris* que expresan el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (YC3.60) durante la simbiosis con *R. tropici* DsRed en donde se puede apreciar el núcleo de la célula. B) Representación de la fluorescencia del ratio YFP/CFP. Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de color que va del rojo al verde ubicado a la derecha de la imagen B. C) Representación gráfica de los cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la región nuclear del pelo radical. Escala  $10\mu\text{m}$ .

Posteriormente se analizaron los pelos radicales durante los procesos más tardíos del proceso de infección; por ejemplo, a los 6 días post-inoculación se observaron hilos de infección (Figura 16 y 17) y a los 7 días se vieron los primordios de nódulos (Figura 18).

Los resultados que consideramos más interesantes son las visualizaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante la formación del hilo de infección en pelos radicales a los 6 días post inoculación. En la Figura 16C, se muestra la localización de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que coincide con la ubicación del hilo de infección, lo cual puede comprobarse en la Figura 16E, donde en rojo se indica la localización de la bacteria en el mismo hilo de infección mediante la expresión de la proteína DsRed. El cual, es un dato importante dado que no

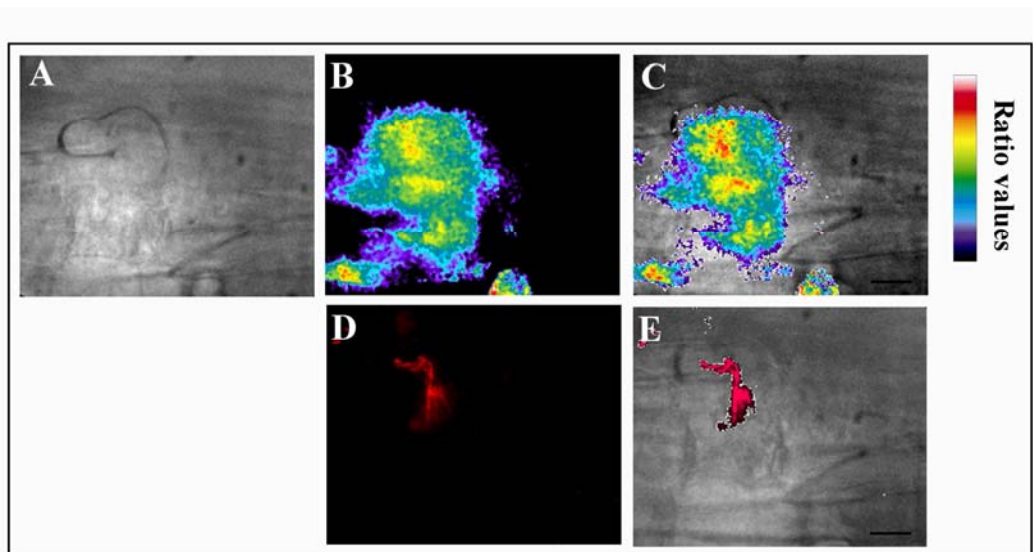
se tienen reportes del estudio y la visualización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en estas etapas, lo cual constituye una de las grandes ventajas de utilizar estas sondas moleculares.

Al analizar la Figura 16C y la Figura 16E, se observa que la señal tanto del  $\text{Ca}^{2+}$  como de la bacteria se encuentran localizadas en la misma región, indicándonos que el aumento en la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  y la progresión del hilo de infección están relacionados. Este resultado adquiere un particular interés debido a que el hilo de infección es una estructura que se encuentra en crecimiento con un patrón que puede considerarse polar al igual que el crecimiento mismo del pelo radical, simplemente porque mantiene una región apical en crecimiento. Estos aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células que se encuentran formando el hilo de infección co-localizan con los sitios en donde se distribuye las invasiones del hilo de infección. Esto podría sugerir que la célula infectada necesita de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  para mantener el crecimiento del hilo de infección al igual que lo requiere el pelo radical durante el crecimiento normal.



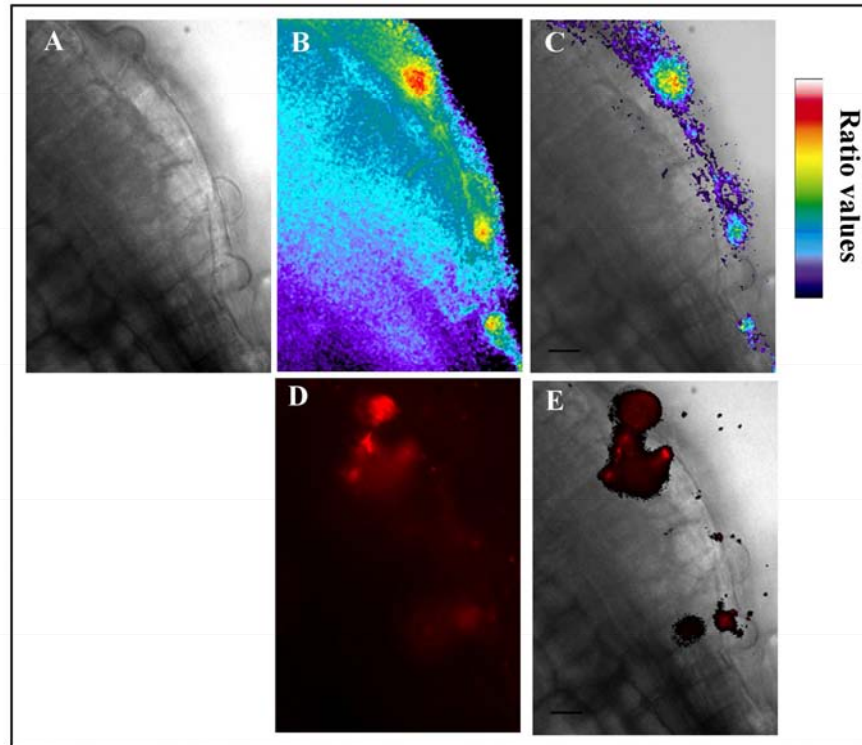
**Figura 16. Visualización del calcio intracelular durante el inicio de la formación del hilo de infección en plantas compuestas de *Phaseolus vulgaris* después de la inoculación con *Rhizobium tropici* DsRed.** A) Imagen de luz transmitida de un pelo radical de una planta compuesta de *P. vulgaris* inoculada con *R. tropici* DsRed, el pelo presenta la formación de la estructura del hilo de infección, por el cual avanza la bacteria durante la simbiosis. B) Imagen de los valores de fluorescencia (ratio) del sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (YC3.60) durante la simbiosis con *R. tropici* DsRed. C) Representación de los valores de fluorescencia del ratio YFP/CFP más alto sobre la imagen de luz transmitida del pelo radical (A y B), en la que se observa la colocalización más alta de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  con el lugar donde se encuentra el hilo de infección. Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de pseudocolor que va del violeta al rojo ubicado a la derecha de las imágenes. D) Imagen de fluorescencia del mismo pelo radical antes descrito inoculado con la bacteria que expresa a la proteína DsRed a lo largo del hilo de infección. E) Representación de la fluorescencia de DsRed de la bacteria en un hilo de infección sobrelapada con la imagen de luz transmitida del pelo radical (A y D). En la imágenes se observa que tanto la señal de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (panel C) como de la bacteria (panel E), se encuentran co-localizados en sitios muy definidos indicando la posible participación de  $\text{Ca}^{2+}$  durante este proceso. Escala 10 $\mu\text{m}$ .

Conforme avanza el hilo de infección, podemos observar que el patrón persiste, es decir, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  co-localiza con la ubicación de los hilos de infección a juzgar por la fluorescencia de las bacterias (Figuras 17C y 17E). Además, los resultados resultan aún más interesantes si consideramos que cuando los hilos de infección empiezan a inervar las células más internas del córtex, en donde se están dividiendo las células que darán origen al primordio, los sitios más internos del hilo de infección están caracterizados por un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esta co-localización refuerza aun más la idea que el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene un papel en el progreso del hilo de infección y que este resulte esencial en el mantenimiento del ápice del hilo de infección en continuo crecimiento.



**Figura 17. Localización del calcio intracelular durante la formación del hilo de infección de plantas compuestas de *Phaseolus vulgaris* después de la inoculación con *Rhizobium tropici* DsRed.** A) Imagen de luz transmitida de un pelo radical de una planta compuesta de *P. vulgaris* inoculada con *R. tropici* DsRed, el pelo presenta la formación del hilo de infección, por el cual avanza la bacteria durante la simbiosis. B) Imagen de fluorescencia del sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (YC3.60) durante la simbiosis con *R. tropici* DsRed de la imagen en A. C) Representación de la fluorescencia del ratio YFP/CFP sobrelapada con la imagen de luz transmitida del pelo radical (A y B), en la que se observa la colocalización de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  con el lugar donde se encuentra el hilo de infección. Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de pseudocolor que va del rojo al violeta mostrado ubicado a la derecha de las imágenes (rojo más calcio y violeta menos calcio, de acuerdo a los valores de ratio). D) Imagen de fluorescencia de un pelo radical inoculado con la bacteria que expresa a la proteína DsRed. E) Representación de la fluorescencia de DsRed sobre la imagen de luz transmitida del pelo radical (A y D) durante la simbiosis con *R. tropici* DsRed. En las imágenes se observa que tanto la señal de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (panel C) como de la bacteria (panel E), co-localizan, sugiriendo la posible participación de  $\text{Ca}^{2+}$  durante este proceso. Escala 10 $\mu\text{m}$ .

Finalmente, resultó de gran interés analizar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante la formación de un primordio de nódulo (Figuras 18C y 18E) y nuevamente encontramos una colocalización de la bacteria con la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que corresponden al lugar donde se está llevando a cabo la infección. Los resultados generados después de la inoculación con *Rhizobium* (Figuras 16, 17 y 18) nos permitieron identificar si el  $\text{Ca}^{2+}$  estaba participando en la simbiosis durante las diversas etapas del desarrollo del hilo de infección y si estos niveles se mantenían en un primordio de nódulo. Estos resultados son novedosos, ya que a la fecha no se había visualizado la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  durante este proceso de la infección y mucho menos en estados avanzados de la migración del hilo de infección, como se puede observar, existe una clara diferencia entre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células del primordio comparada con las células del resto de la raíz. En general, esto se observa como un aumento significativo de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células que conforman el primordio, y aun mas en donde se define el paso de los hilos de infección.



**Figura 18. Localización del calcio intracelular en un primordio de nódulo de plantas compuestas de *Phaseolus vulgaris* inoculada con *Rhizobium tropici* DsRed.** A) Imagen de luz transmitida de un primordio de nódulo de una planta compuesta de *P. vulgaris* inoculada con *R. tropici* DsRed. B) Imagen de fluorescencia correspondiente a la imagen A del sensor de calcio intracelular (YC3.60) durante la simbiosis con *R. tropici* DsRed. C) Representación de la fluorescencia del ratio YFP/CFP sobrelapada con la imagen de luz transmitida del primordio de nódulo (A y B), en la que se observa la colocalización de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  con el lugar donde se encuentra los hilos de infección. Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de pseudocolor que va del violeta al rojo ubicado a la derecha de las imágenes. D) Imagen de fluorescencia de un primordio de nódulo inoculado con la bacteria que expresa a la proteína DsRed. E) Representación de la fluorescencia de DsRed sobre la imagen de luz transmitida del primordio de nódulo (A y D) durante la simbiosis con *R. tropici* DsRed. En la imágenes se observa que tanto la señal de fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (panel C) como de la bacteria (panel E) colocalizan, sugiriendo la posible participación del  $\text{Ca}^{2+}$  durante este proceso. Escala 10 $\mu\text{m}$ .



## DISCUSIÓN.

El calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un nutriente esencial en las plantas. Como catión divalente tiene una función estructural en la pared celular de las plantas aunque su función principal es como segundo mensajero en el citoplasma (Marschner, 1995). Se sabe que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de plantas aumenta en respuesta a cambios tanto del desarrollo como ambientales. Es por eso que en este trabajo se estudió cómo cambia la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante la simbiosis entre rhizobia y plantas leguminosas así como su localización durante el progreso del hilo de infección.

Para realizar los objetivos planteados, se generaron plantas transgénicas que expresan a un sensor de calcio, Camaleón. La estrategia que se utilizó para evaluar la utilidad de Camaleón en la medición de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fue generar tanto plantas transgénicas estables (*Lotus japonicus*) como compuestas (*Phaseolus vulgaris*). La generación de líneas transgénicas estables nos permitió analizar la capacidad de Camaleón para responder a los cambios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de los pelos radicales y en un futuro nos permitirá estudiar el proceso de la simbiosis, proceso que no ha sido estudiado *in vivo*.

Una de las diferencias entre las dos plantas modelos, es que *L. japonicus* es una planta más pequeña con respecto al frijol, lo cual hace que *Lotus* sea metodológicamente más manipulable en el estudio de la simbiosis en etapas del desarrollo tardías. Las plantas de *L. japonicus* que expresan la construcción YC2.1 se germinaron y el crecimiento de las plántulas se continuó en macetas, con la finalidad de obtener la segunda generación para realizar posteriormente retrocruzas y generar plantas homocigotas para la expresión de Camaleón. Sin embargo, una de las desventajas de *L. japonicus* es la duración del período de crecimiento, es decir, una planta adulta requiere de 6 meses para generar semillas, es por eso, que a la fecha se encuentra en crecimiento la segunda generación del lote de plantas transgénicas que se utilizaron en este trabajo.

Por otra parte, el frijol es un modelo de estudio utilizado en el laboratorio y para este trabajo se logró generar plantas compuestas de frijol que permitieron realizar experimentos a corto plazo para seguir el proceso de la infección, además existe un interés particular de trabajar con plantas de *P. vulgaris* debido a su implicación agronómica. Ambas estrategias nos permitieron estudiar los cambios en la

concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en los pelos radicales. Una vez que se seleccionaron los modelos de estudio, se analizaron las construcciones de Camaleón YC2.1 y YC3.60, siendo la última la que mejor responde a los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y coincidentemente la más estudiada en plantas de *A. thaliana* (Monshausen, 2008).

Estudios previos en plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresa la proteína Camaleón versión 3.60, han determinado que la proteína es capaz de percibir cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático de los pelos radicales. Por esta razón, en la Figura 11 se analizaron plantas *A. thaliana* para corroborar que los datos generados por nuestro sistema de adquisición de imágenes, así como los tratamientos aplicados a las plantas, correlacionan con los datos reportados en el trabajo del 2008 de Monshausen (Figura 3A). Tanto en este trabajo como en el nuestro, los resultados obtenidos indican que es posible registrar el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el ápice de los pelos radicales mediante Camaleón.

A partir de los datos obtenidos en *Arabidopsis*, se decidió utilizar la versión 3.60 del Camaleón para la generación de las plantas compuestas, además, esta versión tiene una mayor intensidad de fluorescencia y es más estable a cambios de pH con respecto a la versión 2.1. Las plantas generadas se analizaron por microscopía de fluorescencia para estudiar la simbiosis de las rhizobia con las plantas leguminosas.

En 1999, Cárdenas *et al.* utilizaron el colorante Fura-2 dextran para analizar los cambios en la concentración de calcio en pelos radicales de *P. vulgaris* después de la aplicación de los FNs. Con la finalidad de corroborar que nuestro modelo de estudio era capaz de registrar una respuesta similar, se aplicaron los FNs a los pelos radicales en crecimiento de las plantas compuestas de *P. vulgaris*. Observamos que efectivamente, hay un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Figura 13) a los pocos segundos de la aplicación de los FNs. Estos cambios son similares a los cambios reportados por Cárdenas *et al.* (1999), en donde inicialmente el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se observa en la región cercana al ápice y minutos después en la región nuclear. Este fenómeno fue también observado en este trabajo (Figura 14), los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se presentan como oscilaciones en la región perinuclear. La similitud en la respuesta observada en los dos trabajos mencionados es un indicativo de que el sensor de calcio, Camaleón es un herramienta útil para medir los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Además es un método relativamente sencillo de manipular debido a que nos permite tener plantas transgénicas en un lapso relativamente corto de tiempo (un mes) con respecto a la segunda generación de plantas transgénicas estables de *Lotus*. Esta estrategia nos permitió estudiar otras etapas del proceso de infección y en particular, determinar los cambios en la concentración de calcio durante el proceso simbiótico, lo cual no había sido estudiado previamente.

En este trabajo, no solo se estudiaron los cambios en la concentración de calcio después de la aplicación de los FNs, sino también se analizó que sucedía con las concentraciones de calcio durante la interacción con *Rhizobium*. En la Figura 15, se muestra un pelo radical vivo de *P. vulgaris* inoculado con *R. tropici* donde se observa el cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la región cercana al núcleo sugiriendo que la célula está respondiendo a la infección y que el  $\text{Ca}^{2+}$  sigue teniendo un papel durante la infección. Es interesante notar que el núcleo se encuentra cercano a la región basal del pelo radical. Esto es relevante porque se ha propuesto que el núcleo migra hacia esta parte de la célula durante la infección (Lloyd *et al.*, 1987), sugiriendo la posibilidad de un redireccionamiento de los componentes celulares.

En la formación del hilo de infección se han descrito componentes similares a los de la pared celular de la planta, como es el caso de las pectinas y xiloglucanos (Rae A.L. *et al.*, 1992). Además, se han descrito proteínas que pueden estar relacionadas con la formación del hilo de infección y el desarrollo de los pelos radicales como es NAP (por sus siglas en inglés, Nck-associated protein) y Pir1 (por sus siglas en inglés, 121f-specific p53 inducible RNA), que están involucradas en los rearrreglos de actina y son esenciales en la formación del hilo de infección. Mutaciones en *Nap1* muestran un fenotipo alterado en el desarrollo de los tricomas (Deeks *et al.*, 2004; Yokota *et al.*, 2009) lo cual es interesante dado que tanto en la formación del hilo de infección como en el desarrollo de los pelos radicales el crecimiento es polarizado, lo cual podría indicar que se estarían utilizando mecanismos similares para llevar a cabo la transducción de la señal.

Trabajos previos han mostrado que es necesario mantener un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ápice del pelo radical para permitir su crecimiento (Hepler *et al.*, 2001; Cole *et al.*, 2006; Cárdenas, 2009). Dado que el calcio está relacionado con varios procesos del desarrollo y la colocalización de la señal de calcio con el progreso de la infección

sugiere una posible regulación de ambas señales para la culminación exitosa de la simbiosis. Los resultados obtenidos en este trabajo apoya la posibilidad que durante la formación del hilo de infección este gradiente de calcio cambie de dirección por el redireccionamiento del pelo radical.

Para analizar esta hipótesis se inocularon plantas de frijol con *R. tropici* DsRed (Figuras 16, 17 y 18). Los resultados indican que el proceso de infección en las raíces independientemente del grado de avance de la infección, el  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra presente en los sitios que corresponden a la región del hilo de infección que se encuentra en crecimiento de plantas compuestas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* DsRed.

En las células analizadas la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  está claramente colocalizada con los sitios de infección. Este dato ha sido reportado previamente y resulta de gran relevancia poder correlacionar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  con el desarrollo de la infección, porque nos permite preguntarnos que pasará con los demás factores involucrados en el crecimiento de las células polarizadas, como pueden ser los cambios en el pH, la estructura del citoesqueleto y los niveles de las especies reactivas de oxígeno. La relación de los trabajos realizados en células con crecimiento polarizado con el presente, podría abrir una perspectiva en el estudio de la simbiosis de rhizobia con las plantas leguminosas durante las etapas tardías.

La señal de calcio en las células es finamente regulado debido a que concentraciones elevadas de este ion pueden ser citotóxicas para la célula, es por eso que las concentraciones submicromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma se mantienen con las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  y los antiportadores  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Sze *et al.*, 2000; Hirschi, 2001). Estas enzimas remueven el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ya sea al apoplasto o al lumen de los organelos intracelulares, como son la vacuola o el retículo endoplásmico. Sugiriendo la existencia de un mecanismo muy preciso para el progreso de la infección.

Las proteínas que permiten la percepción y transducción de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  se conocen como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ , tal es el caso de proteínas que cambian su conformación o actividad catalítica, como la calmodulina (CaM), calcineurin B-like (CBLs) y proteínas cinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPKs, por sus siglas en inglés). Durante la simbiosis, como se ha mencionado, el calcio tiene un papel importante en la vía de la transducción de la señal se han identificado diversas proteínas que podrían

estar regulando los niveles intracelulares de calcio (Figura 3). En su conjunto, las proteínas permiten que se lleve a cabo la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los pelos radicales de la planta durante la interacción con rhizobia. Por lo cual, se ha considerado la posibilidad de estudiarlas en un futuro, para identificar posibles factores que afectarían el progreso de la infección así como observar cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las raíces de plantas compuestas de frijol.

## CONCLUSIONES

Las sondas moleculares, Camaleón YC2.1 y YC3.60 permitieron visualizar los niveles de calcio intracelular en pelos radicales en crecimiento de las plantas leguminosas, *Lotus japonicus* y *Phaseolus vulgaris*.

Camaleón YC3.60 es una herramienta molecular que permitió visualizar los niveles de calcio intracelular en pelos radicales en crecimiento durante la infección con *Rhizobium*.

Durante la simbiosis de *Rhizobium* con la planta de frijol, hay un incremento muy evidente en los niveles de calcio en la región donde se está formando el hilo de infección y el primordio de nódulo.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.

- Allen, G. J., J. M. Kwak, *et al.* (1999). "Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells." Plant J **19**(6): 735-47.
- Ané, J. M., G. B. Kiss, *et al.* (2004). "Medicago truncatula DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes." Science **303**(5662): 1364-7.
- Aniento, F. and D. G. Robinson (2005). "Testing for endocytosis in plants." Protoplasma **226**(1-2): 3-11.
- Baluska, F., A. Hlavacka, *et al.* (2002). "F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments." Plant Physiol **130**(1): 422-31.
- Berridge, M. J. (1997). "The AM and FM of calcium signalling." Nature **386**(6627): 759-60.
- Bibikova, T. N., A. Zhigilei, *et al.* (1997). "Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity." Planta **203**(4): 495-505.
- Bolle, C. (2004). "The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development." Planta **218**(5): 683-92.
- Brewin, N. J. (1993). "The *Rhizobium*-legume symbiosis: plant morphogenesis in a nodule." Semin Cell Biol **4**(2): 149-56.
- Brock (1989). Biología de los microorganismos, Pearson.
- Capoen, W., S. Goormachtig, *et al.* (2005). "SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(29): 10369-74.
- Cárdenas, L., L. Vidali, *et al.* (1998). "Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals." Plant Physiol **116**(3): 871-7.
- Cárdenas, L., J. A. Feijo, *et al.* (1999). "*Rhizobium* nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs." Plant J **19**(3): 347-52.
- Cárdenas, L., T. L. Holdaway-Clarke, *et al.* (2000). "Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors." Plant Physiol **123**(2): 443-52.
- Cárdenas, L., A. Lovy-Wheeler, *et al.* (2005). "Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes." Cell Motil Cytoskeleton **61**(2): 112-27.
- Cárdenas, L., E. Aleman, *et al.* (2006). "Early responses to Nod factors and mycorrhizal colonization in a non-nodulating *Phaseolus vulgaris* mutant." Planta **223**(4): 746-54.
- Cárdenas, L. (2009). "New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells." Plant Signal Behav **4**(1): 4-8.
- Chen, C. Y., A. Y. Cheung, *et al.* (2003). "Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth." Plant Cell **15**(1): 237-49.
- Cole, R. A. and J. E. Fowler (2006). "Polarized growth: maintaining focus on the tip." Curr Opin Plant Biol **9**(6): 579-88.
- Cullimore, J. V., R. Ranjeva, *et al.* (2001). "Perception of lipo-chitoooligosaccharidic Nod factors in legumes." Trends Plant Sci **6**(1): 24-30.
- Deeks, M. J., D. Kaloriti, *et al.* (2004). "*Arabidopsis* NAP1 is essential for Arp2/3-dependent trichome morphogenesis." Curr Biol **14**(15): 1410-4.
- Ehrhardt, D. W., R. Wais, *et al.* (1996). "Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals." Cell **85**(5): 673-81.
- Endre, G., A. Kereszt, *et al.* (2002). "A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development." Nature **417**(6892): 962-6.

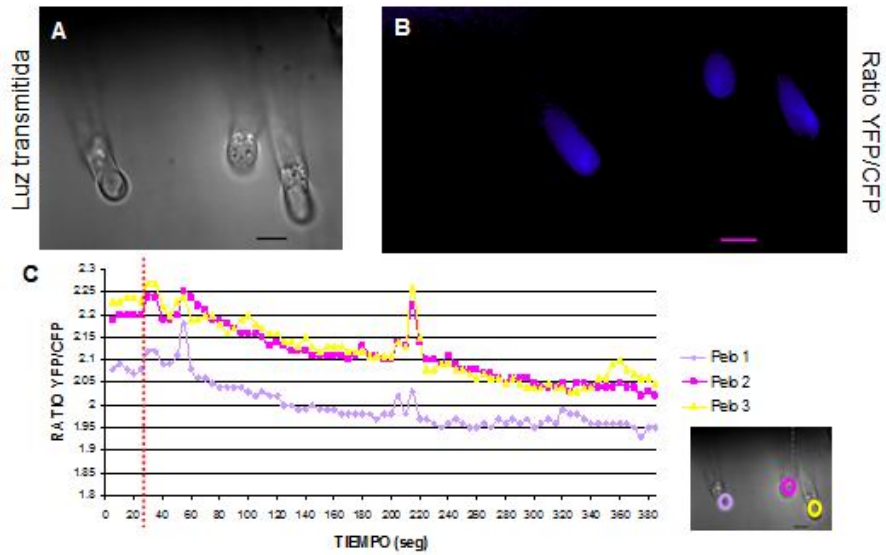
- Estrada-Navarrete, G., X. Alvarado-Affantranger, *et al.* (2006). "*Agrobacterium rhizogenes* transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics." Mol Plant Microbe Interact **19**(12): 1385-93.
- Felle (1995). "Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide." The Plant Journal **7**(6): 939-947.
- Ferguson, B. J., A. Indrasumunar, *et al.* (2010) "Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation." J Integr Plant Biol **52**(1): 61-76.
- Gleason, C., S. Chaudhuri, *et al.* (2006). "Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition." Nature **441**(7097): 1149-52.
- Hepler, P. K., L. Vidali, *et al.* (2001). "Polarized cell growth in higher plants." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 159-87.
- Hepler, P. K. (2005). "Calcium: a central regulator of plant growth and development." Plant Cell **17**(8): 2142-55.
- Hirsch, A. M. (1999). "Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation." Curr Opin Plant Biol **2**(4): 320-6.
- Hirschi, K. (2001). "Vacuolar H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> transport: who's directing the traffic?" Trends Plant Sci **6**(3): 100-4.
- Holdaway-Clarke, T. L., J. A. Feijo, *et al.* (1997). "Pollen Tube Growth and the Intracellular Cytosolic Calcium Gradient Oscillate in Phase while Extracellular Calcium Influx Is Delayed." Plant Cell **9**(11): 1999-2010.
- Holstein, S. E. (2002). "Clathrin and plant endocytosis." Traffic **3**(9): 614-20.
- Hussey (1998). "Microinjection of pollen-specific actin-depolymerizing factor, ZmADF1, reorients F-actin strands in Tradescantia stamen hair cells." Plant Journal **14**: 353-357.
- Imaizumi-Anraku, H., N. Takeda, *et al.* (2005). "Host genes involved in activation and perception of calcium spiking." Plant Cell Physiol **46**: S5.
- Indrasumunar, A. (2007). "Molecular cloning and functional characterisation of soybean (*Glycine max*) nod factor receptor genes (PhD Thesis)." The University of Queensland.
- Indrasumunar, A., A. Kereszt, *et al.* "Inactivation of duplicated nod factor receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.)." Plant Cell Physiol **51**(2): 201-14.
- Iwano, M., T. Entani, *et al.* (2009). "Fine-tuning of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration is essential for pollen tube growth." Plant Physiol **150**(3): 1322-34.
- Kanamori, N., L. H. Madsen, *et al.* (2006). "A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(2): 359-64.
- Landy, A. (1989). "Dynamic, structural and regulatory aspects of lambda site-specific recombination." Ann Rev Biochem **58**: 913-949.
- Lerouge, P., P. Roche, *et al.* (1990). "Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal." Nature **344**(6268): 781-4.
- Levy, J., C. Bres, *et al.* (2004). "A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses." Science **303**(5662): 1361-4.
- Limpens, E., R. Mirabella, *et al.* (2005). "Formation of organelle-like N<sub>2</sub>-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(29): 10375-80.



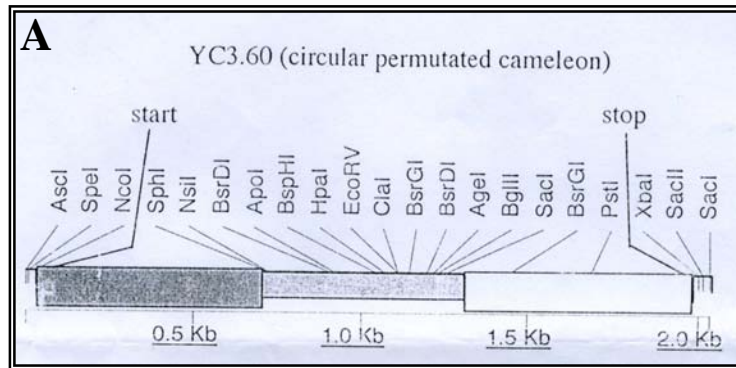
- Lloyd, C. W., K. J. Pearce, *et al.* (1987). "Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration." *Cell Motil Cytoskeleton* **8**: 27-36.
- Madsen, E. B., L. H. Madsen, *et al.* (2003). "A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals." *Nature* **425**(6958): 637-40.
- Malho, R. and A. J. Trewavas (1996). "Localized Apical Increases of Cytosolic Free Calcium Control Pollen Tube Orientation." *Plant Cell* **8**(11): 1935-1949.
- Marschner, H., Ed.2 (1995). *Mineral nutrition of plants*. Boston, Academic Press.
- McCormack, E., Y. C. Tsai, *et al.* (2005). "Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs." *Trends Plant Sci* **10**(8): 383-9.
- Messinese, E., J. H. Mun, *et al.* (2007). "A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*." *Mol Plant Microbe Interact* **20**(8): 912-21.
- Meiri, K. F. (2005). "Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1461): 1663-72.
- Mitra, R. M., C. A. Gleason, *et al.* (2004). "A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4701-5.
- Miwa, H., J. Sun, *et al.* (2006). "Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell." *Plant J* **48**(6): 883-94.
- Miyawaki, A., J. Llopis, *et al.* (1997). "Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin." *Nature* **388**(6645): 882-7.
- Miyawaki, A., O. Griesbeck, *et al.* (1999). "Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2135-40.
- Miyawaki, A. (2003). "Fluorescence imaging of physiological activity in complex systems using GFP-based probes." *Curr Opin Neurobiol* **13**(5): 591-6.
- Monshausen, G. B., M. A. Messerli, *et al.* (2008). "Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*." *Plant Physiol* **147**(4): 1690-8.
- Oldroyd, G. E. and J. A. Downie (2006). "Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling." *Curr Opin Plant Biol* **9**(4): 351-7.
- Perret, X., C. Staehelin, *et al.* (2000). "Molecular basis of symbiotic promiscuity." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(1): 180-201.
- Radutoiu, S., L. H. Madsen, *et al.* (2003). "Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases." *Nature* **425**(6958): 585-92.
- Rae, L., P. Bonfante-Fasolo, *et al.* (1992). "Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*." *The Plant Journal* **2**(3): 385-395.
- Riely, B. K., G. Lounon, *et al.* (2007). "The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots." *Plant J* **49**(2): 208-16.
- Saito, K., M. Yoshikawa, *et al.* (2007). "NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*." *Plant Cell* **19**(2): 610-24.
- Schultze, M. and A. Kondorosi (1998). "Regulation of symbiotic root nodule development." *Annu Rev Genet* **32**: 33-57.
- Smit, P., J. Raedts, *et al.* (2005). "NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription." *Science* **308**(5729): 1789-91.

- Song, W., Z. Zhang, *et al.* (2008). "Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance." *Int J Biol Sci* **4**: 116-125.
- Stracke, S., C. Kistner, *et al.* (2002). "A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis." *Nature* **417**(6892): 959-62.
- Sze, H., F. Liang, *et al.* (2000). "Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: insights from expression in yeast." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 433-62.
- Vidali, L. (2001). "Actin polymerization is essential for pollen tube growth." *Molecular Biology of the Cell* **12**(8): 2534-2545.
- Wais, R. J., C. Galera, *et al.* (2000). "Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13407-12.
- Wais, R. J., D. H. Keating, *et al.* (2002). "Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis." *Plant Physiol* **129**(1): 211-24.
- Yano, K., S. Yoshida, *et al.* (2008). "CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(51): 20540-5.
- Yokota, K., E. Fukai, *et al.* (2009). "Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*." *Plant Cell* **21**(1): 267-84.
- Zeiger, T. (2002). *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Inc.
- Zhang, J., R. E. Campbell, *et al.* (2002). "Creating new fluorescent probes for cell biology." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 906-18.

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS.

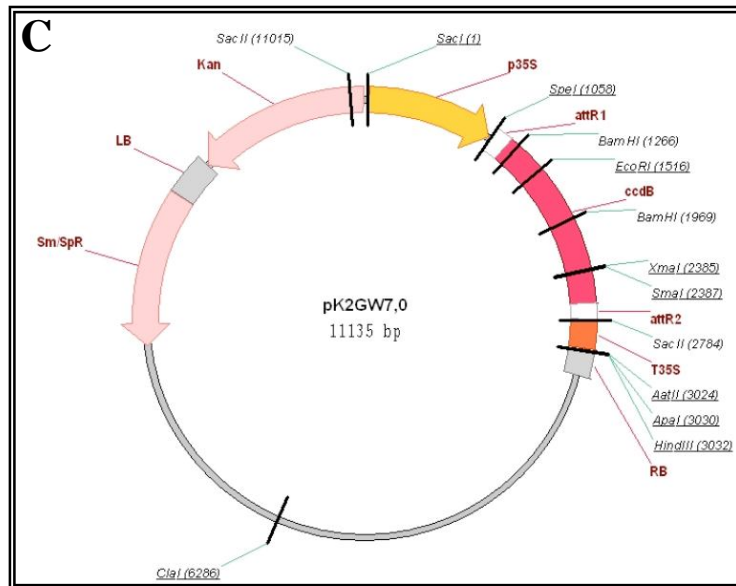


**Figura Suplementaria A. Niveles de calcio intracelular en pelos radicales de *Lotus japonicus* después de la aplicación de ionomicina.** A) Imagen de luz transmitida durante el crecimiento de pelos radicales de raíces de plantas transgénicas de *L. japonicus* que expresan el sensor de calcio intracelular (YC 2.1). B) Representación de la fluorescencia del ratio YFP/CFP de los pelos radicales de *L. japonicus* de panel A, en respuesta al ionóforo (ionomicina), como puede observarse no hay un aumento considerable en la concentración de calcio en la región apical del pelo, lo cual se puede observar en la representación gráfica de los cambios en la concentración del calcio intracelular en una región (círculo de colores indicado en los pelos radicales a la derecha de la grafica. La línea roja indica la aplicación del ionóforo. Los cambios de fluorescencia del análisis de FRET (YFP/CFP) se representan por el gradiente de color azul. Escala 10 $\mu$ m.



**B** Oligonucleótido foward (19nuc)  
 5' CAC CCG ATA CTC GAG GGC G 3'

Oligonucleótido reverse (23nuc)  
 5' CCC CGA TCG TTC AAA CAT TTG GC 3'



**Figura Suplementaria B.** Esquema del tamaño de la secuencia de YC3.60 (panel A), secuencia de oligonucleótidos (panel B) y la estructura del plásmido pK2GW7 (panel C). El cassette de Camaleón YC3.60 se encuentra bajo el promotor 35S, se amplificó con los oligonucleótidos del panel B; el producto fue clonado en un vector de entrada pENTR/TOPO (Invitrogen). Finalmente, se realizó la recombinación con el vector binario pK2GW7 (Karimi, M. *et al.*, 2002), el cual tiene resistencia al antibiótico kanamicina.