



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 cambios de pH en la pared celular  
de los pelos radicales en crecimiento y en respuesta a los  
factores de nodulación”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

LBM. MONSERRAT DÍAZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. LUIS CÁRDENAS TORRES



CUERNAVACA, MORELOS; JUNIO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Carmen Quinto del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Luis Cárdenas Torres

Se agradece la ayuda proporcionada a este proyecto por la Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA) mediante el donativo IN205607, IN204409 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT No 220862.

# AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca de posgrado otorgada, la cual fue importante apoyo para la realización de este trabajo de tesis

A la Dra. Carmen Quinto y su grupo, por su apoyo incondicional en la realización de este proyecto de tesis.

Se agradece el apoyo técnico de la Biol. Olivia Santa Estrada y la Biol. Noreide Nava Nuñez en la realización de este proyecto.

A lo sinodales: Dr. Joseph Dubrovsky y Dra. Gladys Cassab por los consejos en la realización de esta tesis.

A los integrantes del jurado:

Dr. Mario Rocha Sosa

Dra. Isabel López Lara

Dr. Carlos Garay

Dra. Georgina Ponce

Por los comentarios y la dedicación prestada en la revisión y evaluación de esta tesis.

Agradezco al Dr. Luis Cárdenas por toda la experiencia adquirida en todo este tiempo de convivencia y sobre todo por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Bertha, Raúl, Rosana, Karina y David por su compañía y su amistad.

A mis hermanitos académicos: Lily, Nancy, Luigi, Ma Luisa y Jesús, por todos los momentos divertidos y también difíciles que tuvimos en estos dos años. Nunca los olvidaré.

A mis roomies: Claus y Elviux, por su compañía y su incondicional amistad. Siempre recordare con profundo cariño los momentos que convivimos como hermanitas, cuidándonos las unas a las otras.

A mi MADRE por su apoyo y amor. Quien siempre me ha demostrando que cuando se quiere se puede. Este es otro logro que llegamos a alcanzar juntas. Te quiero mucho.

A mi BRO por su cariño y su apoyo.

A mis abuelitos que siempre con su cariño me han acompañado a cada paso que doy en esta vida.

Al amor de mi vida, Roman.

Por su compañía, su comprensión y sobre todo por su amor que hace de nuestra vida juntos una experiencia inolvidable. Hemos cumplido con una meta más...TE AMO.

Y por último y no por eso menos importante al angelito que Dios me envió, NESSY. Eres el principal motor de las cosas que papi y mami hacen. TE AMO MI ANGELITO!!!

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	...	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	...	2
<b>LA PARED CELULAR EN PELOS RADICALES</b>		
1. Composición de la pared	...	4
2. Crecimiento y pared celular	...	6
3. Teoría de crecimiento ácido	...	8
4. Crecimiento de los pelos radicales	...	12
5. Modulación de la pared celular en el crecimiento de pelos radicales	...	13
<b>ANTECEDENTES</b>	...	15
<b>HIPÓTESIS</b>	...	20
<b>OBJETIVOS</b>	...	20
<b>ESQUEMA DE TRABAJO</b>	...	21
<b>METODOLOGÍA</b>		
1. Preparación de las plantas	...	22
2. Medición del pH de la pared celular	...	23
3. Tratamientos	...	27
<b>RESULTADOS</b>	...	29
<b>DISCUSIÓN</b>	...	49
<b>CONCLUSIONES</b>	...	55
<b>PERSPECTIVAS</b>	...	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

## FIG

<b>1</b>	Modelo de los cambios de pH en la pared celular en el crecimiento polar de los pelos radicales	... ..	17
<b>2</b>	Método cuantitativo (ratiometric) utilizando el fluoróforo Oregon green-CBD	... ..	25
<b>3</b>	Método cuantitativo (ratiometric) utilizando el fluoróforo fluoresceína-dextrano-rodamina	... ..	26
<b>4</b>	Localización del fluoróforo Oregon green-CBD en la pared celular de un pelo radical de frijol plasmolizado	... ..	30
<b>5</b>	Cambios de la fluorescencia de un pelo radical de frijol en respuesta a soluciones ácidas y básicas	... ..	32
<b>6</b>	Cambios de pH en la pared celular de un pelo radical vivo en condiciones de crecimiento utilizando la sonda fluorescente Oregon green-CBD	... ..	34
<b>7</b>	Cambios de pH en la pared celular de un pelo radical en condiciones de crecimiento normales utilizando el fluoróforo FDR	... ..	36
<b>8</b>	Cambios de pH en la pared celular en respuesta al influjo de $Ca^{2+}$ utilizando el fluoróforo Oregon green-CBD	... ..	38
<b>9</b>	Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta al ionóforo de $Ca^{2+}$ A23187	... ..	39

<b>10</b>	Cambio de pH en el espacio extracelular en respuesta a la aplicación del DPI	... .. 41
<b>11</b>	Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta a peróxido de hidrógeno	... .. 43
<b>12</b>	Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta al quitosano	... .. 44
<b>13</b>	Cambios de pH en el espacio extracelular de un pelo radical de frijol en respuesta a la aplicación de los FNs de <i>Rhizobium etli</i> .	... .. 46
<b>14</b>	Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta al inhibidor de la bomba de protones de membrana plasmática	... .. 48
<b>15</b>	Modelo propuesto de los cambios de pH en respuesta a los FNs	... .. 51

## RESUMEN

Durante la interacción simbiótica, las leguminosas secretan compuestos flavonoides en la rizósfera y son reconocidos específicamente por las rizobias. Estos flavonoides inducen en la bacteria la expresión de genes involucrados en la síntesis y secreción de los factores Nod (FNs). Los FNs son reconocidos específicamente por los pelos radicales e inducen cambio en los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$ , despolarización de la membrana, organización del citoesqueleto, el hinchamiento apical y el enroscamiento del pelo radical para formar el hilo de infección. El hilo de infección es la estructura celular por donde las bacterias se mueven a través del pelo radical para iniciar la colonización de las células corticales para formar nódulos fijadores de nitrógeno.

En respuesta a los FNs, los pelos radicales presentan un hinchamiento en la región apical y un enroscamiento que permite la formación del hilo de infección. Estos cambios morfológicos involucran una reorganización de la pared celular. En el proceso de crecimiento polarizado presentado por los pelos radicales, se ven implicados cambios en el pH de la pared celular que permiten moldear su estructura rígida para permitir su elongación. Este evento celular se ha estudiado con técnica de microscopía de fluorescencia y se ha observado que estos cambios pueden ser modulados por cambios en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y por la generación de especies de oxígeno reactivas (EOR).

En el presente trabajo desarrollamos una técnica que emplea una sonda fluorescente que es sensible a pH, que nos permita determinar *in vivo* los cambios de pH en la pared celular de los pelos radicales en respuesta a los FNs. Los resultados sugieren que el apoplasto presenta una alcalinización inmediata al tratamiento. Lo que es indicativo de que el pelo radical pudiera presentar un detenimiento inicial en su crecimiento polar en respuesta a los FNs, para permitir los cambios morfológicos subsecuentes.

De igual manera, utilizando esta misma metodología se propuso estudiar los cambios de pH en la pared celular en respuesta a los cambios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y EOR, ya que se sabe que éstos participan activamente en la regulación del crecimiento polar modulando la actividad de la bomba de protones responsable de los cambios de pH en la pared celular.

## INTRODUCCIÓN

La adquisición de nutrientes es esencial para la sobrevivencia de las plantas, tal es el caso de los compuestos nitrogenados. Las leguminosas, por ejemplo han desarrollado la capacidad de establecer simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* para satisfacer una parte importante de sus demandas nutricionales. Para que se establezca esta interacción planta-rizobia, se requiere de un “diálogo molecular”, que implica un intercambio activo de moléculas señales entre ambos simbioses (Cooper 2007).

La simbiosis inicia con una primera fase en la que la raíz de la planta secreta compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides. Estos compuestos actúan como moléculas “señal” que son reconocidos de manera específica por las rizobias., éstos activan de manera específica la expresión de varios genes que codifican para proteínas que son esenciales para la síntesis y secreción de otras moléculas “señal”, llamadas factores Nod (FNs). Los FNs son una mezcla racémica de moléculas que presentan un esqueleto básico de 3, 4 o 5 residuos de N-acetil-D-glucosamina, unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, que dependiendo de cada especie de rizobia tienen modificaciones químicas que incluyen la adición de grupos metilo, acetilo, sulfato, ciertos ácidos grasos y también azúcares modificados (D'Haese and Holsters 2002). Estos FNs al ser secretados a la rizósfera son reconocidos de manera específica y a concentraciones nanomolares inducen una serie de cambios en la planta, principalmente en los pelos radicales en las etapas iniciales de la interacción. Dentro de las respuestas tempranas desencadenadas por los FNs se encuentran incrementos en los flujos iónicos tales como el aumento en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , salida de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  y de  $\text{H}^+$  (Cardenas, Holdaway-Clarke et al. 2000). Estos flujos iónicos son los responsables de la despolarización de la membrana y la eventual alcalinización del citoplasma (Felle 1996; Cardenas, Holdaway-Clarke et al. 2000). Además, se ha descrito que hay una reorganización del citoesqueleto, particularmente de los microfilamentos de actina y los microtúbulos; esto sin duda tiene un papel activo en los cambios morfológicos de los pelos radicales. Estos cambios morfológicos comprenden el hinchamiento en la

zona apical del pelo radical y el posterior enroscamiento, los cuales son importantes para permitirles atrapar las bacterias en su interior (Brewin 2004). Las bacterias atrapadas inducen en la pared celular cambios en el patrón de crecimiento del ápice, sin duda alguna el cambio más importante es la formación de una invaginación en forma de túnel que se reconoce como hilo de infección. Este hilo de infección está formado por material propio de la pared celular y dentro de esta estructura las bacterias se mueven y penetran hacia el córtex de la raíz donde las células ya han iniciado un proceso activo de división mitótica para formar el primordio del nódulo. Cuando el hilo de infección alcanza a las células del primordio, las bacterias se liberan de éste por medio de un proceso de exocitosis y a su vez son endocitadas por las células del primordio en la región del córtex. Dentro de estas células las bacterias quedan rodeadas de una membrana proveniente de la misma planta hospedera que se conoce como membrana peribacteroidal. El primordio se sigue diferenciando hasta formar lo que se conoce como nódulo, un órgano especializado. Dentro de estas estructuras la bacteria se diferencia a bacteroide e inicia la fijación biológica del nitrógeno (Cardenas, Holdaway-Clarke et al. 2000; Oldroyd and Downie 2008).

En el establecimiento exitoso del proceso de infección que se da en el pelo radical ocurren muchos cambios fisiológicos, dentro de los cuales están los que suceden en la pared celular. La pared celular es la primera barrera física con la cual se encuentra la bacteria, por lo tanto, la bacteria ha de contar con la capacidad de poder modular las propiedades físico-químicas y estructurales de la pared que le permitan invertir el crecimiento hacia afuera a un patrón de invaginación. Además, resulta importante entender los procesos que contribuyen a las propiedades estructurales, dentro de los cuales se encuentran los cambios en el pH, actualmente, existen muy pocos enfoques que permitan su estudio *in vivo* durante el proceso de infección lo que constituye el objeto central de nuestro trabajo de investigación que será abordado más adelante.

## LA PARED CELULAR EN LOS PELOS RADICALES

### 1. Composición de la pared celular

La pared celular de las plantas es una estructura bastante compleja, y además de proveer rigidez, soporte y estructura a los tejidos, es al mismo tiempo flexible, para favorecer la forma y el desarrollo de las células. La composición de la pared celular vegetal varía en los diferentes tipos celulares, pero básicamente está formada por una red de microfibrillas de celulosa unidas por medio de hemicelulosa, la cual se encuentra embebida en una matriz hidratada compuesta por pectina y pequeñas proteínas. Todos estos componentes le confieren las propiedades fisicoquímicas que se requieren para soportar la presión de turgencia y al mismo tiempo permitir el proceso de crecimiento celular (Hose, Clarkson et al. 2001).

En la pared celular vegetal también se encuentran proteínas estructurales que en su secuencia peptídica tienen varias repeticiones de uno o dos aminoácidos, las más abundantes son: proteínas ricas en prolina (PRPs), proteínas ricas en glicina (GRPs) y las proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), a éste grupo pertenecen las extensinas, lectinas y las arabinogalactanas (AGPs). Las AGPs tienen forma fibrilar y se inmovilizan mediante enlaces covalentes entre ellas o con carbohidratos. Se sabe que estas proteínas se acumulan en la pared en diferentes etapas del desarrollo celular y en respuesta a diferentes condiciones de estrés (Cassab 1998; Buchanan B.B. 2000; Majewska-Sawka and Nothnagel 2000; Hose, Clarkson et al. 2001; Humphrey, Bonetta et al. 2007). Además, aparte de las proteínas estructurales se encuentran otras proteínas con actividad catalítica relacionadas con la síntesis de pared celular en el proceso de expansión, principalmente la xiloglucano endotransglucosilasa (XET) y endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa (Cosgrove 1999).

La síntesis de algunos de los componentes de la pared celular se lleva a cabo, *in situ*, es decir en la misma pared celular como las microfibrillas de celulosa. La celulosa está dispuesta en cadenas lineales de uniones de monómeros de D-glucosa dado por enlaces  $\beta$

(1-4) y la longitud es variable ya que debe ser lo suficientemente larga como para rodear a la célula varias veces. El ensamblado de las microfibrillas de celulosa se lleva a cabo en la membrana por acción de un complejo compuesto por aproximadamente 36 subunidades de celulosa sintasa (CESA), que se encuentran organizadas en subunidades de hexámeros llamadas subunidades de rosetas, y a su vez forman el complejo en roseta que se encuentra embebido en la membrana plasmática. Se ha descrito que el proceso de síntesis de la cadena de celulosa se inicia con el esteroil glicosilado que junto con el 5'-glucosa difosfato forman pequeñas cadenas de esteroil-glucanos formando cebadores para que el complejo CESA incorpore unidades de D-glucosa a las cadenas nacientes; posteriormente *in muro* la endoglucanasa KOR remueve el residuo esteroil, para ayudar a la cristalización de la fibrilla (Nicol and Hofte 1998; Cosgrove 2005; Taiz L 2006).

Los componentes de la matriz extracelular esencialmente son dos: las pectinas y las hemicelulosas. La síntesis de ambos componentes se lleva a cabo en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico, y posteriormente son transportados al espacio extracelular por medio del tráfico vesicular exocítico. La hemicelulosa está formada por cadenas de  $\beta$ -D glucanos, las más abundantes son los xiloglucanos y tienen cadenas similares a las de la celulosa, con la diferencia de ser ramificados cada 3 o 4 residuos con D-glucosa, con residuos de xilosa, galactosa o fructosa; además de los xiloglucanos están los arabinoxilanos, formados por cadenas  $\beta$  (1-4) xilanos con ramificaciones de arabinosa, ácido glucorónico y ésteres de ácido felúrico (FAE). Además de estos tipos de  $\beta$ -D-glucanos también se encuentra el manano formando parte de la pared celular. La existencia de enzimas del tipo CESA-like (CSL) en el aparato Golgi indica que éstas son las principales candidatas para la síntesis de la cadena  $\beta$ -D de glucanos de la hemicelulosa (Cosgrove 2005).

Las pectinas son cadenas de polisacáridos compuestas por azúcares ácidos como el ácido galacturónico y azúcares neutros como la ramnosa, galactosa y la arabinosa. Las cuales están sujetas a modificaciones *in muro* (como son las esterificaciones y

metilaciones) que permiten cambiar su conformación y su anclaje a la pared (Moustacas, Nari et al. 1986; Moustacas, Nari et al. 1991). Las enzimas encargadas de la síntesis de estos polisacáridos son las polisacárido-glucosil-transferasas dependiente de nucleótidos (Taiz L 2006).

## **2. Crecimiento y pared celular**

La expansión celular tienen un papel importante en el proceso de crecimiento de la célula vegetal permitiéndole tener una regulación fina de su forma y tamaño; en este proceso la pared celular da soporte estructural y al mismo tiempo presenta una gran plasticidad que favorece el crecimiento.

La síntesis de la pared involucra los siguientes pasos (Taiz L 2006):

1. Síntesis de los componentes primarios: como se describió antes, la síntesis de las microfibrillas de celulosa se realiza en la membrana celular mediante el complejo CESA. Por otro lado, los componentes de la matriz extracelular compuesta por hemicelulosa y las pectinas se sintetizan en el aparato de Golgi por las glucosiltransferasas.
2. Secreción de componentes de la pared celular: los elementos que conforman la matriz extracelular, son transportados por el sistema vesicular y son depositados directamente en el exterior de la célula mediante procesos de exocitosis. Las microfibrillas de celulosa son sintetizadas a nivel de membrana y la celulosa se deposita directamente en la matriz extracelular como ya se describió anteriormente. Todos estos componentes son depositados en un estado esterificado y por lo tanto estas estructuras no son rígidas sino flexibles lo cual contribuye en gran medida al crecimiento apical.
3. Ensamblado de los componentes de la pared celular: existen dos teorías acerca de cómo se lleva a cabo. La primera está basada en las propiedades fisicoquímicas de

los componentes de la pared y considera que los polímeros de ésta tienen la habilidad inherente de autoagregarse y formar estructuras semi-ordenadas. La segunda teoría, que es la más probable que suceda, está basada en el procesamiento de los componentes de la pared celular mediada por la acción de enzimas apoplásticas, por ejemplo, las *hidrolasas* están involucradas en la reducción y viscosidad de la matriz extracelular. Las *endoglucanasas*, hidrolizan las uniones glucosídicas. El pH óptimo para la función de estas enzimas es de 5 y por debajo de este pH la actividad disminuye. Un ejemplo es la endonucleasa KOR de las dicotiledóneas, la cual se ha caracterizado y se sabe que forma parte de la membrana celular, aunque su pH óptimo es de aproximadamente 6.5, se ha visto que mutantes en este gen en *Arabidopsis* presentan un fenotipo de patrones irregulares en la extensión de su pared celular, son delgadas y desordenadas. Lo cual indica el papel importante que juega el pH en la pared celular. Las enzimas *XET*, por ejemplo, catalizan una reacción de transferencia en donde la cadena de xiloglucano es escindida y una de las cadenas liberadas de este corte, se agrega al extremo no reducido de una segunda cadena de xiloglucano. La otra actividad que se le atribuye es la incorporación de xiloglucano recién depositado extracelularmente en la pared (Cosgrove 1999; Vissenberg, Fry et al. 2001; Cosgrove 2005).

En relación con el estado de crecimiento de la célula es pertinente mencionar que, cuando ésta detiene su crecimiento, empieza a sintetizar una pared secundaria, la cual, dependiendo del tipo celular que se trate modificará la composición de sus polímeros (Taiz L 2006).

El crecimiento celular se inicia con un incremento de la presión de turgencia, seguido de la modificación estructural de la pared, permitiendo así la extensión de la célula en respuesta al estrés mecánico generado por este gradiente osmótico; simultáneamente se incorpora nuevo material para la síntesis de la pared celular. La alteración de las

propiedades fisicoquímicas de la pared permite modular la relajación y la rigidez de ésta, permitiendo que sea flexible y moldeable y que su integridad no se afecte; lo cual es mediado por la ruptura o debilitamiento de las interacciones de varios de los componentes de la pared. Las enzimas relacionadas con las modificaciones de las propiedades de la pared son varias, éstas están involucradas en el proceso de ensamblaje de la misma tales como: la XET, las hidrolasas, endoglucanasas, las expansinas, además de otros factores como las especies de oxígeno reactivas (EOR) como el ión hidroxilo y el  $\text{Ca}^{2+}$ , entre otros iones (Pennell 1998; Cosgrove 2005; Humphrey, Bonetta et al. 2007).

La expansión celular puede realizarse mediante un crecimiento de tipo isotrópico (en todas partes) o polarizado (localizado). El crecimiento de tipo polar se caracteriza por el crecimiento exclusivo en una región particular de la célula, que puede ser el ápice de un pelo radical, del tubo polínico o la hifa de un hongo. En esta situación, la pared celular en la región basal se encuentra en un estado de mayor rigidez que no permite una elongación, mientras que en el ápice, la pared es más flexible y favorece el crecimiento. El crecimiento polarizado está dirigido por la inserción local de vesículas secretorias que incorporan precursores y enzimas involucradas en la síntesis de nueva pared en la parte apical (Martin, Bhatt et al. 2001). Las células que crecen de forma polar tienen un sistema de crecimiento que puede ser constante u oscilatorio, éste último consiste en períodos de expansión rápido alternado con períodos lentos (Monshausen, Bibikova et al. 2007).

### **3. Teoría del crecimiento ácido**

Las modificaciones de las propiedades de la pared celular son importantes en el proceso de expansión celular. La teoría que más se ha estudiado para explicar el mecanismo por el cual la pared se expande es la teoría del crecimiento ácido, la cual se basa en la capacidad de la acidificación de la pared celular permitiendo cambios en su estructura que favorecen su extensión y por lo tanto el crecimiento. Esto se ha probado adicionando hormonas de crecimiento vegetal como las auxinas o en respuesta a la

aplicación localizada de soluciones ácidas (Rayle and Cleland 1992). La estimulación ácida consiste no sólo en la modificación de las propiedades de los componentes de la pared, sino que también requiere de proteínas activas que promuevan la extensión. De forma general, las auxinas estimulan la síntesis de la pared, el incremento en la elasticidad, la activación de genes que codifican para enzimas o proteínas estructurales involucradas en el proceso de síntesis y promueve de manera importante la expulsión de protones a la región apoplástica acidificando la pared celular y promoviendo la expansión (Rayle and Cleland 1992; Cosgrove 2005).

La idea de que una condición de pH ácido puede promover el crecimiento de la pared celular se basa en el debilitamiento de los puentes de hidrógeno que unen a la celulosa con la hemicelulosa; también se considera que el pH ácido pudieran estar estimulando alguna proteína involucrada en el procesamiento o propiedades de la pared, tales como enzimas o proteínas estructurales. De hecho, se ha visto que la extensión mediada por ácido se ve alterada por metales pesados ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) y se cree que pudieran estar inhibiendo reacciones enzimáticas involucradas en la plasticidad de la pared. Dentro de las enzimas que pueden promover la expansión bajo condiciones de acidez están la XET y las xiloglucano hidrolasas (Cosgrove 2000; Vissenberg, Fry et al. 2001; Hager 2003).

Las expansinas son otro grupo importante de proteínas que tienen un papel fundamental en las propiedades de la pared celular y se han estudiado ampliamente durante el proceso de expansión por cambios en el pH. Además, estas proteínas se expresan principalmente durante el crecimiento y diferenciación celular. Existen dos grandes familias de expansinas: las  $\alpha$  y  $\beta$ , aunque tienen una gran homología, las de tipo  $\beta$  se encuentran N-glucosiladas a diferencia de las  $\alpha$ . Esta familia de proteínas presenta dos grandes dominios, denominados 1 y 2. El primero de ellos se encuentra relacionado con la familia de las endoglucanasas porque tienen cisteínas conservadas y un grupo HFD (histidina, fenilalanina y ácido glutámico) formando posiblemente un sitio catalítico, aunque esta actividad no se ha encontrado. En el caso del dominio 2 se encuentra un

motivo de unión a polisacáridos. Estas características y su dependencia del pH para regular las propiedades de elongación de la pared celular las convierten en proteínas claves para la regulación del crecimiento celular y de hecho algunas de ellas solo se expresan en la raíz (Cosgrove, Li et al. 2002).

El mecanismo general por el cual se lleva a cabo la regulación de las propiedades de la pared celular mediada por las expansinas está basado en el debilitamiento de las uniones entre los polisacáridos que la componen. Se ha propuesto que las expansinas al unirse a las fibras de celulosa, hemicelulosa o pectinas, de alguna manera pueden promover el relajamiento de las uniones de manera dependiente de pH y permitir además, el acceso de las enzimas propiamente encargadas de la expansión celular (Cosgrove 2000).

La auxina es una fitohormona que tiene un efecto notable sobre el crecimiento. Esta puede inducir la hiperpolarización de la membrana y la consecuente salida de protones a la parte apoplástica. Esta salida de protones hacia el espacio extracelular podría estar dirigida por la activación de una bomba de protones dependiente de ATP o H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática (MP), ya que se ha observado que hay un incremento de esta proteína en la membrana en respuesta a auxina (Hager 2003). Además, se ha sugerido que la activación de la bomba de protones depende de una disminución del pH citoplásmico de 7.2-7.5 a 6.5 lo cual favorece su actividad. Sin embargo, también puede activarse por fosforilación mediada por proteínas cinasas, en respuesta a un incremento en IP<sub>3</sub> o Ca<sup>2+</sup> citoplásmico. Este intercambio de protones genera un cambio en el potencial de membrana, cargándola negativamente, lo cual podría regular la entrada y salida de muchos otros iones que probablemente también contribuyen a las propiedades de la pared celular (Hager 2003).

La bomba de protones de la MP es una ATPasa del tipo P (fosforilación, por su sigla en inglés). En plantas tiene la función de generar un gradiente de pH que ayuda en el mantenimiento de potencial de membrana, el cual es requerido en funciones celulares

tales como: transporte secundario, en apertura y cierre de estomas, crecimiento, en tolerancia a estrés salino, regulación del pH intracelular y la expansión celular. El peso de esta proteína es de aproximadamente 100 kDa y se compone de una subunidad catalítica  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  glucosilada. Sus dominios amino y carboxilo terminal son citoplasmáticos, posee de 10 a 12 dominios transmembranales y un sitio de autoinhibición en el dominio carboxilo. Estas características estructurales de la bomba de protones de la MP son compartidas por otras especies celulares como levaduras y células con crecimiento de tipo polar como hongos y tubos polínicos (Morsomme and Boutry 2000; Gaxiola, Palmgren et al. 2007).

En *Arabidopsis* se han encontrado aproximadamente 10 genes que codifican para bombas de protones de MP y se le han denominado *AHA*. En los pelos radicales, la bomba de protones específica de la MP es la *AHA2*. La estructura de la bomba *AHA2* consiste en 4 dominios: el dominio transmembranal compuesto por 10 hélices y tres dominios citosólicos: N (dominio de unión a nucleótido), P (sitio de fosforilación) y A (sitio del activador). El sitio R (regulador) se encuentra en el carboxilo terminal, el cual es característico de las bombas  $H^+$ ATPasa tipo P. Se propone que el sitio de unión de  $H^+$  se encuentra en los residuos Aspartato (Asp) 684 y 106, los cuales forman el vestíbulo del transportador (“gate keeper” en inglés) (Pedersen, Buch-Pedersen et al. 2007; DUBY and Boutry 2009).

La expresión génica de la bomba  $H^+$ -ATPasa de la MP es regulada a nivel transcripcional, post-traducciona l y a nivel de actividad enzimática. Se sabe que transcripcionalmente la bomba de protones de la MP es modulada por diferentes estímulos tales como: las condiciones nutricionales, ambientales o de exposición a elicitores. La regulación a nivel postraducciona l que presenta la bomba de protones depende de la fosforilación de la Tirosina 947 y de su interacción con la proteína 14-3-3, mediante el desplazamiento del carboxilo terminal, evitando la autoinhibición de la

bomba por fosforilación (Morsomme and Boutry 2000; Dambly and Boutry 2001; Gaxiola, Palmgren et al. 2007; Duby and Boutry 2009; Duby, Poreba et al. 2009).

#### **4. Crecimiento de los pelos radicales**

Los tricoblastos son células de la epidermis que tienen la capacidad de formar pelos radicales. El tricoblasto que forma un pelo radical es una célula diferenciada que presenta un crecimiento longitudinal, sin embargo, bajo ciertas condiciones este crecimiento puede ser modificado por un crecimiento de tipo lateral formando extensiones tubulares denominados pelos radicales, los cuales son las estructuras celulares que aumentan en gran medida la superficie de contacto con el medio extracelular y que contribuyen de manera importante a la absorción de agua, nutrientes y contribuye al anclaje en el suelo (Carol and Dolan 2002). Además, los pelos radicales en el caso de las plantas leguminosas se encuentran involucrados en la interacción con bacterias del suelo para formar simbiosis y establecer una asociación esencial para la vida del planeta, tal como lo es la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (Downie and Walker 1999; Cooper 2007).

Los pelos radicales presentan un crecimiento polarizado, y al igual que en los tubos polínicos, éste es oscilatorio (Gilroy and Jones 2000). El desarrollo de estas células involucra de manera general cuatro pasos: el primer paso es la *especificación de destino celular*, esto involucra la formación de células del meristemo que se convertirán en tricoblastos. El segundo paso es la *iniciación del pelo radical* que comienza cuando la parte latero-distal de la célula que se encuentra expuesta hacia el apoplasto presenta una expansión localizada formando un pequeño hinchamiento en la pared celular, llamado sitio de inicio. Posteriormente, en un tercer paso, en este sitio de la célula se establece el *crecimiento polar*, proceso donde se lleva a cabo la incorporación continua de nuevo material que permite la síntesis de la pared en la zona apical. Este proceso celular requiere de una gran capacidad exocítica y endocítica, así como de cambios en los flujos iónicos y una coordinada regulación de los elementos del citoesqueleto, todo esto favorece un

crecimiento apical acelerado y oscilatorio. Por último se detiene el crecimiento del pelo radical y comienza su maduración (Baluska, Salaj et al. 2000; Gilroy and Jones 2000; Carol and Dolan 2002; Monshausen, Messerli et al. 2008), en esta etapa los pelos radicales se vuelven sumamente resistentes a los cambios del medio.

## **5. Modulación de la pared celular en el crecimiento de pelos radicales**

La elongación de los pelos radicales depende de la organización de la pared celular y ésta depende en gran medida de la presión de turgencia, pH extracelular, proteínas dependientes de pH, etc. (Pennell 1998). Durante el crecimiento polarizado se mantiene un crecimiento polar activo, que es distinto al de una célula que no está en crecimiento continuo. Esto es aún más complejo si consideramos que los pelos radicales mantienen una alta actividad de endocitosis y exocitosis (tráfico de vesículas), activación de canales iónicos, organización del citoesqueleto, presencia de un gradiente apical de  $\text{Ca}^{2+}$ , generación de las especies de oxígeno reactivas (EOR), etc. Los procesos de elongación y síntesis de nueva pared celular tienen que tomar lugar en un espacio limitado que se encuentra en constante recambio, el ápice o domo apical (Messerli, Danuser et al. 1999; Monshausen, Messerli et al. 2008).

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un ion que se ha estudiado ampliamente como segundo mensajero en la fisiología celular (Tuteja and Mahajan 2007). Además de funcionar como un segundo mensajero en células vegetales, también puede desempeñar funciones estructurales muy importantes ya que determina las propiedades de rigidez de la pared celular. Para esto es importante entender un poco el proceso de síntesis y ensamblaje de los componentes de la pared celular. Las cadenas de pectinas en los pelos radicales se secretan en forma neutra o esterificadas (Sherrier and VandenBosch 1994). Estas pectinas esterificadas son suaves por naturaleza (consistencia de gel) y posteriormente las pectinas son de-esterificadas *in muro* mediante la actividad de las enzimas pectina metil esterasas (PME, por sus siglas en inglés). Esta enzima permite la exposición de residuos ácidos en las

cadenas de pectina recién secretadas (Moustacas, Nari et al. 1986; Moustacas, Nari et al. 1991). Posteriormente, el  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentra en el apoplasto se une a los residuos ácidos de las pectinas y se entrecruzan con las cadenas adyacentes, dando como resultado un aumento en la rigidez de la pared celular (Carpita and Gibeaut 1993).

Otro de los elementos que juega un papel esencial en las propiedades de la pared celular lo constituye la bomba de protones de la MP, la cual se ha encontrado en la región apical de los pelos radicales y en los tubos polínicos. Estudios realizados en el 2008 (Cortal, Almeida et al. 2008), sugieren que la salida controlada de protones en la región apical constituye un paso esencial en la modulación de las propiedades de la pared celular y por consiguiente del crecimiento (Cortal, Almeida et al. 2008). Existen evidencias del papel de las especies de oxígeno reactivas (EOR) en las propiedades de la pared celular (Foreman, Demidchik et al. 2003; Knight 2007). Por ejemplo, en presencia de patógenos, la respuesta hipersensible induce una liberación masiva de EOR que favorecen el entrecruzamiento de los componentes de pared celular y por lo tanto evita la entrada del patógeno. De hecho la adición de un inhibidor de las NADPH oxidasas de membrana, una enzima generadora de EOR, puede bloquear el crecimiento polar de los pelos radicales (Monshausen, Bibikova et al. 2007). Esto implica que las EOR pueden tener un efecto directo sobre el proceso de síntesis de pared celular y sobre sus propiedades. Actualmente, se sabe que la actividad de las NADPH oxidasas es la producción de EOR en los pelos radicales y que estas EOR resultan indispensable para la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Foreman, Demidchik et al. 2003). El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  generado es fundamental para mantener el gradiente apical necesario para el mantenimiento del crecimiento polar, sobre todo para los procesos de exocitosis y endocitosis que permiten la secreción de los precursores de la pared celular (Foreman, Demidchik et al. 2003; Knight 2007). Finalmente, es importante mencionar que dentro de este escenario, los mecanismos de exocitosis y endocitosis requieren de un citoesqueleto intacto, el cual también juega un papel fundamental en el crecimiento y mantenimiento de la polaridad en conjunto con el  $\text{Ca}^{2+}$ , EOR y varias proteínas que regulan la organización de los microfilamentos y microtúbulos (Baluska, Salaj et al. 2000).

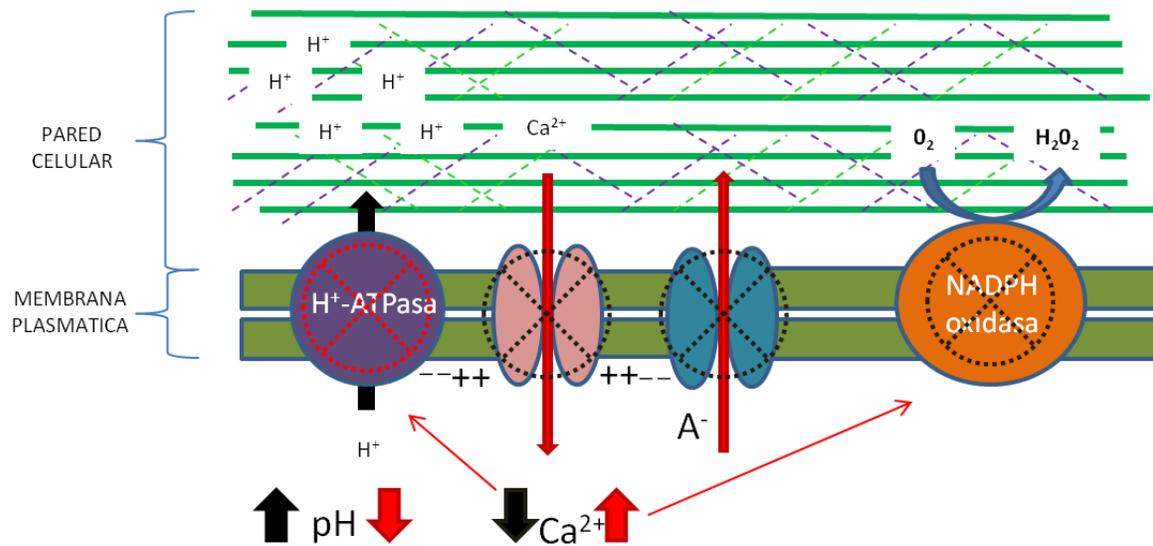
## ANTECEDENTES

En los pelos radicales, durante el proceso de expansión celular las bombas de protones de la membrana plasmática se activan. Estas bombas de protones se han inmunolocalizado en la región apical (Samuels, Fernando et al. 1992) y se les ha relacionado con la acidificación de la pared celular. En este proceso de acidificación en la pared celular, se activan y reclutan a las expansinas, provocando que la pared tenga una mayor flexibilidad. Además, la acidificación apoplástica también provoca que se activen canales de  $K^+$ , por lo tanto, existe el aumento de la presión de turgencia, lo cual se sabe que es importante en la expansión de la célula. El aumento de la turgencia en conjunto con la flexibilidad de la pared celular, eleva la presión interna de la célula provocando que la membrana plasmática se extienda (Baluska, Salaj et al. 2000). Estas ideas se han reforzado recientemente con los trabajos realizados en los pelos radicales de *Arabidopsis* utilizando sondas fluorescentes para visualizar cambios de pH en la pared celular (Monshausen, Bibikova et al. 2007; Monshausen, Bibikova et al. 2009). Mediante estos enfoques se ha definido que la emergencia del pelo radical está determinada por el establecimiento de una región ácida muy localizada en la pared celular. De manera interesante ésta acidificación extracelular en la región de la pared celular está acompañada por una alcalinización correspondiente en la región citoplásmica (Bibikova, Jacob et al. 1998). Esto sugiere que la acidificación de la pared celular tiene un papel importante en la iniciación del crecimiento polar de los pelos radicales (Bibikova, Jacob et al. 1998; Fasano, Swanson et al. 2001). Más recientemente, se ha demostrado que el crecimiento de los pelos radicales es oscilatorio y está determinado en gran medida por episodios de cambios en el pH de la pared celular y cambios en los niveles de EOR (Monshausen, Bibikova et al. 2007). La conclusión a la que llegan estos autores es que las fases de crecimiento rápido están reguladas de forma importante por la acidificación de la pared celular, mientras que los episodios de crecimiento lento están acompañados por una alcalinización (Monshausen, Bibikova et al. 2007).

Estudios relacionados con la participación de EOR en la síntesis y modulación del crecimiento de la pared celular se han basado principalmente en el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en el radical OH. Se sabe que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  apoplástico interacciona con los residuos fenólicos de los polímeros de la pared celular contribuyendo en la rigidez de la misma (Hohl 1995). En el caso del radical OH, se ha visto que su participación en el apoplasto es la de debilitar las uniones entre los polímeros de la pared, permitiendo su relajamiento en el proceso de elongación celular. (Liszky, Kenk et al. 2003). Estos resultados no permiten especular que las EOR apoplásticas participan activamente en la estructuración de la pared celular.

En nuestro grupo de trabajo existen datos preliminares que se han realizado utilizando ionóforos para  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulados que pueden liberarse por la foto-activación con luz UV. Mediante estos experimentos hemos podido observar que la foto-liberación de ionóforos para  $\text{Ca}^{2+}$  en una parte lateral del ápice en crecimiento es capaz de generar un foco de alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  que puede establecer un nuevo sitio de crecimiento polar. El hecho de que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  pueda modular o redirigir el crecimiento nos permite sugerir que el  $\text{Ca}^{2+}$  también está directamente relacionado con la capacidad de modular o regular las propiedades de la pared celular.

Basados en las evidencias antes descritas, proponemos un modelo que permite relacionar a los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la producción de EOR apoplástico con los cambios de pH en la pared celular (figura 1). Uno de los eventos celulares que se observan en el establecimiento del crecimiento polarizado es el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico participa en la modulación de varias proteínas, entre ellas la inactivación de la bomba de protones y la activación de las NADPH oxidasa de membrana encargadas de la producción de EOR apoplásticas; estos eventos celulares contribuyen en general a detener la elongación celular. Al disminuir el nivel citoplásmico de  $\text{Ca}^{2+}$  la actividad de la bomba de protones se ve restablecida y el apoplasto se acidifica. Este decremento del pH activa proteínas de la pared celular que permiten el relajamiento de la misma, permitiendo la elongación celular.



**Figura 1. Modelo de los cambios de pH en la pared celular en el crecimiento polar de los pelos radicales.** En el establecimiento del crecimiento polar de los pelos radicales la regulación de los cambios de pH en la pared celular es esencial para mantener la dirección de la elongación celular. En las etapas iniciales del crecimiento polar, uno de los eventos mejor caracterizados son los influjos de Ca<sup>2+</sup> y su participación en la despolarización de la membrana mediante la activación de canales iónicos de la membrana. Se ha estudiado que el aumento del Ca<sup>2+</sup> citoplásmico bloquea a la bomba de protones de membrana plasmática induciendo una alcalinización apoplástica. Esta alcalización inactiva a enzimas apoplásticas encargadas de la incorporación de nuevo material en la pared. Al mismo tiempo el Ca<sup>2+</sup> activa a las NADPH oxidasas de membrana plasmática encargadas de generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el apoplasto, el cual interacciona con los componentes de la pared celular para darle rigidez. Todos estos eventos están relacionados con el detenimiento del crecimiento celular. Esta vía está señalada en el esquema con las flechas de color rojo. Cuando los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular presentan un decremento, la bomba de protones se activa, induciendo una acidificación apoplástica. Este pH ácido promueve la modificación estructural de proteínas de la pared y activa enzimas apoplásticas que permiten el relajamiento de las interacciones de los componentes de la pared permitiendo así la elongación celular. Estudios a cerca de generación apoplástica de radicales hidroxilo por las peroxidasas apoplásticas, siguen su participación en el debilitamiento de la pared celular. Esta vía está señalada en el esquema con las flechas de color negro.

La pared celular tiene un papel muy importante en el desarrollo de toda célula vegetal, sin lugar a dudas es el primer contacto que tiene la célula con su medio externo. Durante el establecimiento de la simbiosis que se da entre plantas leguminosas y las rizobias, los pelos radicales constituyen la interfase inicial entre el simbiote y la planta hospedera ya que es a través de estas células que la bacteria inicia el proceso de infección. Durante mucho tiempo se ha especulado sobre la capacidad que debe de tener la bacteria para modificar el patrón de crecimiento polar de los pelos radicales e inducir la formación de una nueva estructura, el hilo de infección. El hilo de infección es en cierta forma un pelo

radical en crecimiento pero en dirección contraria. Los FNs, son la pieza clave para entender muchos de los sucesos que ocurren durante la simbiosis, ya que ellos son capaces de estimular las respuestas tempranas de pre-infección y la deformación del pelo radical para iniciar la formación del hilo de infección. Sin embargo, se requiere de la presencia de la bacteria para llevar a cabo el desarrollo del hilo de infección hasta el córtex de la raíz, en donde se forma el primordio de nódulo. Esto significa que los FNs son suficientes para modificar el patrón de crecimiento del pelo radical que lleva a la formación del hilo de infección. También se sabe que éstos inducen la división celular en el córtex sin la formación del hilo de infección y que los exopolisacáridos producidos por la bacteria podrían ser un complemento importante, así como la estimulación mecánica en un sitio particular.

La respuesta temprana de los pelos radicales a los FNs comienza con el cambio de los flujos de iones a través de la membrana produciendo una despolarización de su potencial y una alcalinización del citoplasma. El proceso se inicia con un influjo masivo de  $\text{Ca}^{2+}$  que es seguido por un eflujo de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  para mantener el equilibrio del potencial de membrana (Cardenas, Holdaway-Clarke et al. 2000). Este movimiento de iones también está acompañada de la salida de protones durante la despolarización (Downie and Walker 1999). Uno de los cambios iónicos más estudiados es sin lugar a duda la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, lo cual genera un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentra en el ápice del pelo radical y tiene lugar en el primer minuto posterior a la aplicación de los FNs (Cardenas, Feijo et al. 1999; Oldroyd and Downie 2008). Después de 10-15 minutos se inducen oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la periferia del núcleo (Cardenas, Feijo et al. 1999) los cuales recientemente se han identificado como cambios reales en el interior del núcleo (Sieberer, Chabaud et al. 2009). Finalmente, todos estos eventos aunados a cambios en la organización del citoesqueleto (Cardenas, Vidali et al. 1998) contribuyen con el cese temporal del crecimiento polar de los pelos radicales (Cardenas, Thomas-Oates et al. 2003). Es importante mencionar que los FNs son capaces de inducir una alcalinización del citoplasma lo cual se ha sugerido que pudiera correlacionarse con una acidificación del

espacio extracelular (Felle 1996). De aquí la posibilidad de que esta acidificación inducida de manera específica por los FNs pudiera favorecer los cambios morfológicos necesarios para la formación del hilo de infección.

El hilo de infección es una invaginación del pelo radical y se observa como una columna de matriz extracelular que se encuentra invadida por las bacterias y está rodeada con material de la pared celular propia de la planta. Es probable que la rizobia utilice las vías de señalización que promueven la remodelación del proceso normal de crecimiento celular a su propio beneficio, cambiando así la polaridad del crecimiento. Uno de los cambios morfológicos más reportados en los pelos radicales es el hinchamiento de su región apical, lo cual ocurre aproximadamente una hora después de ser tratados con los FNs. Esto es interesante ya que algo similar ocurre cuando se aplican expansinas exógenas en pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* (Cosgrove, Li et al. 2002). En las leguminosas, los pelos radicales posteriormente sufren un enroscamiento como requisito para atrapar a las bacterias y re-direccionar el crecimiento del pelo radical y formar el hilo de infección (Brewin 2004).

La utilización de sondas fluorescentes como herramienta biotecnológica, ha permitido estudiar *in vivo* los eventos celulares que participan en el crecimiento polarizado de los pelos radicales. En el presente trabajo se estableció un sistema que permite medir y monitorear los cambios de pH en la pared celular *in vivo* y abordar el estudio de estos cambios en los pelos radicales de plantas leguminosas durante el crecimiento normal y en respuesta a los FNs, así mismo se estudia la relación entre los cambios de pH en la pared celular y la utilización de compuestos que modifican los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y EOR en células vivas.

## **HIPÓTESIS**

Los cambios de pH en la pared celular son necesarios para el crecimiento del pelo radical y los FNs son capaces de modificar la estructura de la pared celular facilitando el proceso de infección, posiblemente induciendo cambios de pH en la pared.

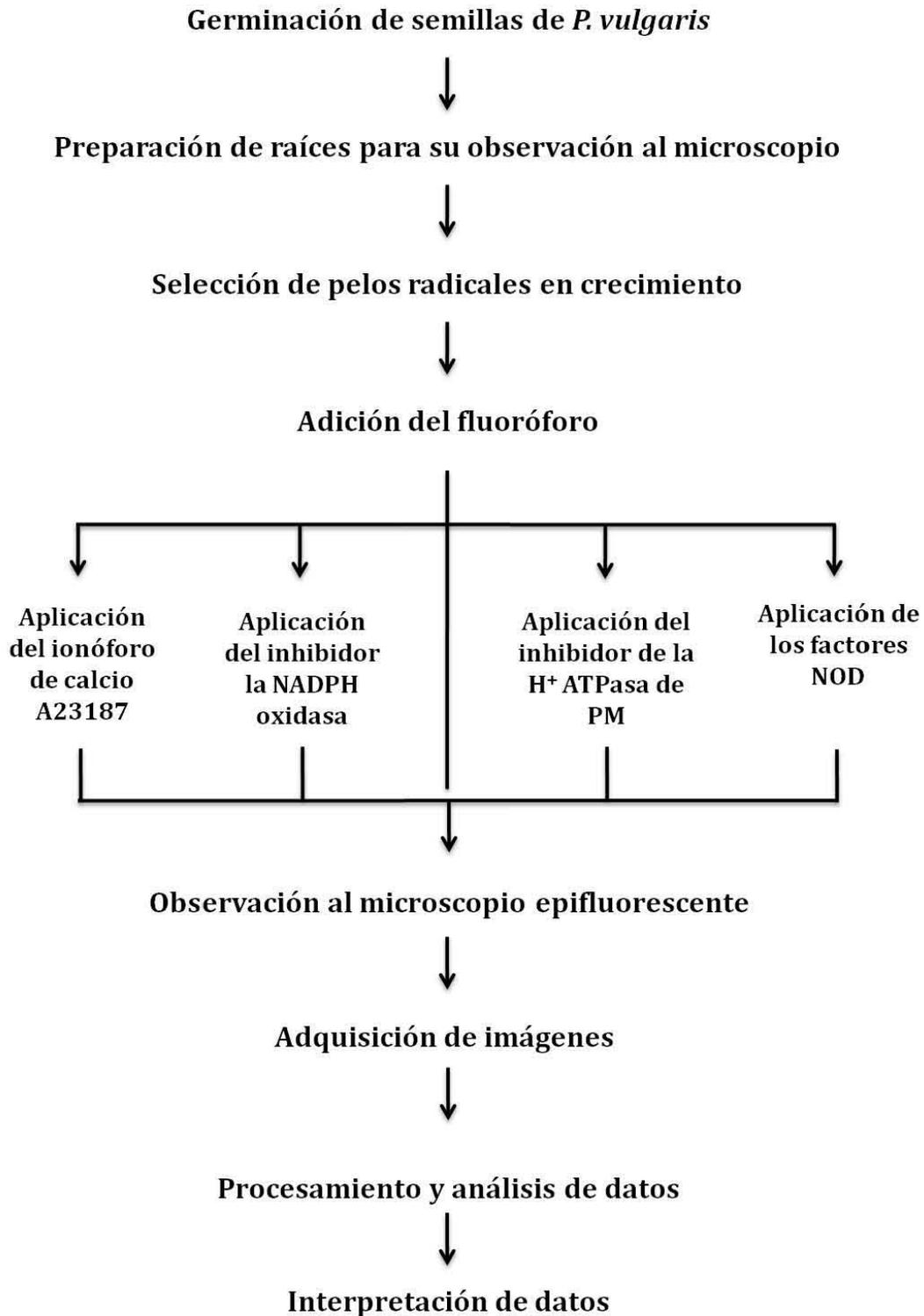
## **OBJETIVO GENERAL**

1. Determinar los cambios de pH en la pared celular de pelos radicales vivos de *Phaseolus vulgaris* durante la respuesta a los FNs.

## **Objetivos Particulares**

1. Optimizar las condiciones experimentales para la determinación de los cambios de pH en la pared celular de pelos radicales de *Phaseolus vulgaris* en crecimiento.
2. Determinar los cambios de pH en la pared celular en respuesta a los FNs de *Rhizobium etli*
3. Determinar la posible relación entre los cambios de pH en la pared celular con cambios en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y de las EOR en la célula.
  - 3.1 Determinar los cambios de pH en la pared celular de los pelos radicales en respuesta al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la aplicación del ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187.
  - 3.2 Determinar los cambios de pH en la pared celular de los pelos radicales en respuesta a la disminución de la producción de las especies de oxígeno reactivas mediante la aplicación de un inhibidor de las NADPH oxidasas de membrana plasmática.
  - 3.3 Determinar los cambios de pH en la pared celular de los pelos radicales en respuesta a la aplicación de peróxido de hidrógeno.
  - 3.4 Determinar los cambios de pH en la pared celular de los pelos radicales en respuesta a la aplicación de quitosano como inductor de la producción de las especies de oxígeno reactivas.

## ESQUEMA DE TRABAJO



## **METODOLOGÍA**

### **1. Preparación de las plantas**

#### Preparación de las semillas para su germinación

*Phaseolus vulgaris* v. negro jamapa

En un matraz de vidrio se colocaron las semillas de *Phaseolus vulgaris* v. negro jamapa y se lavaron repetidas veces con agua corriente hasta que el agua de lavado estuviera limpia. Las semillas se escurrieron y en la campana de flujo laminar se trataron con etanol absoluto cubriéndolas completamente y se mantuvieron en agitación durante un minuto. Pasado este tiempo se lavaron con agua mili-Q estéril, dos veces. Posteriormente se agregó al matraz una solución de Cloralex al 20%, hasta cubrir las semillas y se agitaron durante 5 minutos. Finalmente las semillas se lavaron con agua mili-Q estéril, aproximadamente 5 veces o hasta que el agua de enjuague salga limpia.

#### Germinación de las semillas

*Phaseolus vulgaris* v. negro jamapa

Las semillas se germinaron sobre toallas de papel absorbente previamente humedecidas con el medio de cultivo Färhaeus\* (Fahraeus 1957), dentro de una charola estéril, dispuestas en hileras y de manera alternada. Después de colocadas las semillas, la charola es cubierta con papel aluminio. La charola es colocó en una cámara de incubación a 28 °C durante 48 horas, tiempo al cual las plántulas alcanzan una longitud en su raíz de 2 cm.

\*La lista de los componentes y concentraciones del medio de cultivo se encuentran al final de la metodología.

## Preparación de las plántulas para su observación al microscopio

Para observar las plántulas en el microscopio invertido se utilizan cajas de Petri modificadas con un cubreobjeto en el fondo. Estas cajas pueden contener medio Färhaeus líquido o una capa fina de fitagel al 1 % con 1 ml de medio Färhaeus líquido.

Las plántulas se colocaron en estas cajas especiales y se cubrieron con papel celofán estéril. Las plántulas se incubaron 24 horas a 28 °C, con ciclos de luz-oscuridad. En este tiempo la raíz alcanza aproximadamente 3 cm de largo y genera abundantes pelos radicales.

## **2. Medición del pH de la pared celular**

### Principios de la metodología

Las sondas fluorescentes sensibles a pH son herramientas relativamente nuevas que permiten mediciones directas *in vivo* en la distribución espacial y temporal del pH apoplástico en tejidos de planta mediante microscopia de fluorescencia. Esto se ha facilitado aún más con la generación de estas sondas fluorescentes acoplados a un dextrano o a un epítotope de unión a la pared celular, tal es el caso de la péptido CBD (celulose binding domain, por sus siglas en inglés) que permite incorporar la sonda fluorescente a la pared celular y que no permiten su internalización.

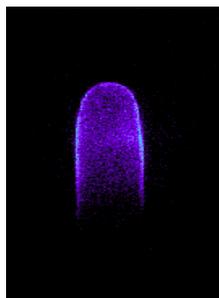
El principio de la técnica consiste en tratar la planta viva bajo condiciones normales de crecimiento con un fluoróforo sensible a pH y medir su fluorescencia. Esta sonda fluorescente a cierta longitud de onda tiene la propiedad de fluorescer dependiendo del pH y a otra longitud de onda su fluorescencia no depende del pH, por lo tanto se utiliza como un marcador de fluorescencia de referencia para establecer métodos cuantitativos o semicuantitativo (ratiometric, por su nombre en inglés). La fluorescencia de la imagen del cociente las dos longitudes de onda es relativa al pH e independientes de la concentración del fluoróforo. Gracias a esta doble propiedad de excitación del fluoróforo, cualquier

variación causada por la concentración de colorante debido a una distribución diferencial del citoplasma, no repercute sobre los valores de medición del pH.

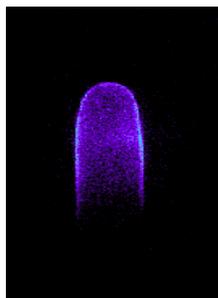
La primera técnica que se empleó en este trabajo fue introducida por Fasano y col., 2001 (Fasano, Swanson et al. 2001). Consiste en el empleo del fluoróforo Oregon green conjugado covalentemente a un péptido que tiene un dominio de unión a celulosa (CBD) de la enzima celulasa de *Clostridium cellulovorans*. Debido a que el CBD se une a las paredes de las células, el sensor de pH Oregon Green-CBD queda unido o se asocia a la pared celular del pelo radical en crecimiento. El rango dinámico de pH de este fluoróforo es de 3–6.

El conjugado Oregon-green-CBD se diluyó en medio Färhaeus y se liberó en la proximidad de la raíz que contiene los pelos radicales. Después de un minuto de incubación se lavó el exceso del colorante y se excitó a una longitud de onda de 440 nm (pH-independiente) y 480 nm (pH-dependiente). Se colectó la emisión a 520 nm (Figura 1 A-C). Para este estudio se utilizó un objetivo de inmersión en agua de 60X. Las imágenes tanto de fluorescencia como de luz transmitida se capturaron utilizando una cámara de CCD (siglas en inglés de “charge-coupled device” o dispositivo de carga acoplada) (Roper Scientific) y se utilizó el programa especializado de captura de imágenes Methamorph/Methafluor (Universal Imaging, Philadelphia), acoplado a un sistema de filtros giratorio (Lambda, Shutter instruments, Arizona). Las imágenes se obtuvieron por medio de un microscopio de epifluorescencia (Nikon). Los resultados obtenidos, se graficaron seleccionando regiones específicas del pelo radical, los cuales están marcadas en la figura 1D. Los datos colectados en esta zona se graficaron y se procesaron utilizando Excel (Microsoft office).

A) Imagen de fluorescencia excitada a 480 nm y la emisión colectada a 520 nm (pH dependiente).



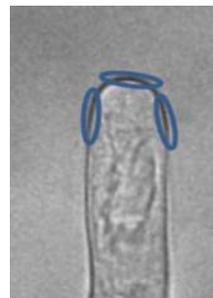
B) Imagen de fluorescencia excitada a 440 nm y la emisión colectada a 520 nm (pH independiente).



C) Imagen de fluorescencia (480 nm/440 nm)



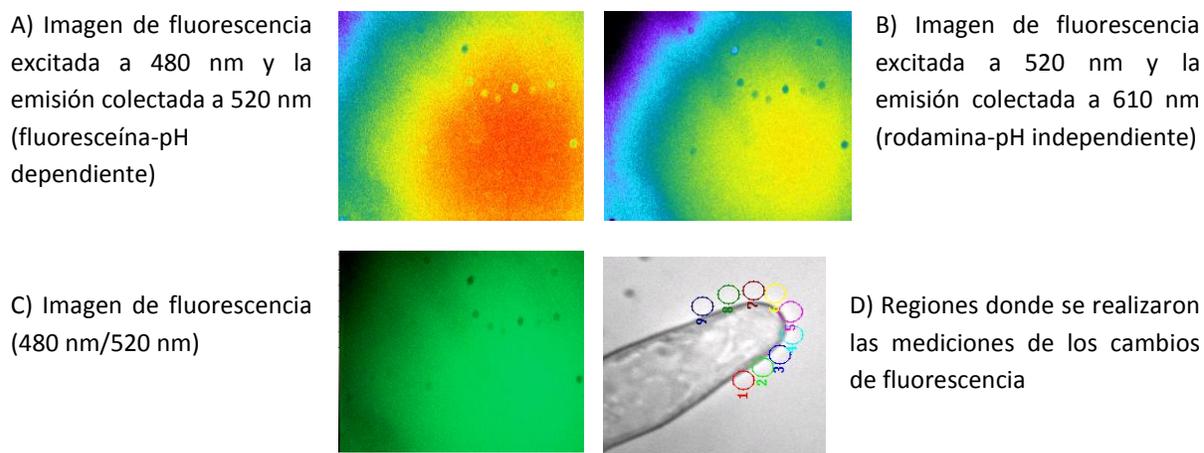
D) Regiones donde se realizaron las mediciones de los cambios de fluorescencia



**Figura 2. Método cuantitativo (ratiometric) utilizando el fluoróforo Oregon green-CBD.** A) Imagen de fluorescencia de un pelo radical de frijol obtenida a una excitación de 480 nm y la emisión colectada a 520nm. Los cambios registrados a esta longitud son dependientes de los cambios de pH en la pared celular. B) Imagen de fluorescencia del mismo pelo radical del panel A, obtenida a una excitación de 440 nm y emitida a 520 nm. Los cambios registrados a esta longitud de onda son independientes de los cambios de pH en la pared celular. C) Imagen de fluorescencia obtenida del cociente de las emisiones de 480 nm/440 nm. Con este cociente se obtuvieron los valores reales de los cambios de fluorescencia en la pared celular. D) Imagen de luz transmitida del pelo radical donde se indica con círculos en colores los puntos donde se midieron los valores de la fluorescencia para obtener los datos que posteriormente se graficaron.

La segunda técnica utilizada emplea un fluoróforo de nueva generación no probado aún en plantas, este consiste en utilizar la fluoresceína (sensible a cambios de pH) acoplada una molécula de dextrano (70 kDa) y una de rodamina. El dextrano permite que el compuesto permanezca en el espacio extracelular y no ingrese a la célula, por lo tanto es posible visualizar los cambios de pH en la proximidad de la pared celular. Este conjugado permite realizar análisis cuantitativos ya que la fluoresceína es sensible a los cambios de pH en el apoplasto y la rodamina se utiliza como un marcador de referencia. De esta forma es igualmente posible realizar análisis semi-cuantitativos (ratiometric). El rango dinámico de pH de este fluoróforo es de 5-9.

El fluoróforo fluoresceína-dextrano-rodamina diluido en medio Färhaeus a una concentración de 4 ng/ml, se depositó en las proximidades de la raíz que contiene los pelos radicales. Después de un periodo de incubación de  $\approx 8$  horas. Se excitó a una longitud de onda de 520 nm (pH-independiente) y 480 nm (pH-dependiente), y la emisión se colectó a 520 nm y 610 nm, respectivamente (Figura 2 A-C). Se utilizó un objetivo de inmersión en agua de 60X. Las imágenes tanto de fluorescencia como de luz transmitida se capturan utilizando una cámara de CCD (Roper Scientific) y el programa especializado de captura de imágenes, Methamorph/Methafluor (Universal Imaging, Philadelphia), acoplado a un sistema de filtros giratorio (Lambda, shutter instruments). El equipo de microscopia consiste en un microscopio Nikon TE eclipse (Nikon, Japón). Para la obtención de los datos se seleccionaron regiones específicas del pelo radical, las cuales están marcada con círculos de colores en la figura 2D. Los datos colectados en esta zona se graficaron y se procesaron utilizando Excel (Microsoft office).



**Figura 3. Método cuantitativo (ratiometric) utilizando el fluoróforo fluoresceína-dextrano-rodamina.** A) Imagen de fluorescencia de un pelo radical de frijol obtenida a una excitación de 480 nm y la emisión colectada a 520 nm. Los cambios registrados a esta longitud son dependientes de los cambios de pH en la pared celular. B) Imagen de fluorescencia del mismo pelo radical del panel A, obtenido a una excitación de 520 nm y la emisión colectada a 610 nm. Los cambios registrados a esta longitud de onda son independientes de los cambios de pH en la pared celular. C) Imagen de fluorescencia obtenida del cociente de las emisiones de 480 nm/610 nm. Con este cociente obtenemos los valores reales de pH en la pared celular. D) Imagen de luz transmitida de pelo radical donde se indica con círculos de colores los puntos donde se midieron los valores de fluorescencia para obtener los datos graficados.

El análisis de la fluorescencia y la edición de las imágenes se realizaron usando el programa de análisis de las imágenes MetaFluor/Methamorph de Universal Imaging. Los valores de fluorescencia se normalizaron obteniendo el cociente de los valores de la fluorescencia a 480 nm /440 nm en el caso del fluoróforo Oregon green-CBD y a 480 nm /520 nm en el caso del fluoróforo FDR, y los datos de los cambios de fluorescencia presentados en esta tesis es el resultado de este análisis de datos.

#### Preparación del fluoróforo Oregon green-CBD

100 µg del péptido-CBD de la enzima celulasa de *Clostridium cellulovarans* (Sigma) se incubaron con 10 mM Oregon green 488 succinimidyl ester (Molecular Probes, Eugene, OR) en 50 mM de buffer fosfato, pH 8.0 por 2 horas a temperatura ambiente. El fluoróforo no conjugado fue retirado por diálisis en buffer fresco a 48 °C por 18 horas.

### **3. Tratamientos**

#### Obtención e inoculación de FNs

Los FNs de *Rhizobium etli* purificados por HPLC según la técnica descrita por Cárdenas y col., 1995 (Cardenas, Dominguez et al. 1995), se diluyeron en CHAPS al 0.01 % a una concentración de 100 nM. Antes de su aplicación, los FNs se mezclaron con 0.5 ml del medio de cultivo y se agregaron directamente a los pelos radicales; considerando el volumen inicial de la cajas de crecimiento, los FNs generalmente quedan diluidos a una concentración de 10 nM.

#### Aplicación del inhibidor de las NADPH oxidasas e ionóforo de Ca<sup>2+</sup>

Los pelos radicales previamente tratados con los fluoróforos sensores de pH se les aplicaron diversos tratamientos:

- En presencia de ionóforo de Ca<sup>2+</sup> A23187 para estudiar los cambios de pH en respuesta a influjos de Ca<sup>2+</sup>.

- En presencia de DPI (diphenyleneiodonium chloride) para estudiar el efecto de la disminución de los niveles de EOR producido por la inhibición de la actividad de las NADPH oxidasas de membrana plasmática sobre el pH de la pared celular.
- En presencia de peróxido de hidrógeno y quitosano para estudiar los cambios de pH en la pared celular en respuesta a EOR.
- Vanadato de sodio como inhibidor de la actividad de la bomba de protones de membrana plasmática como control negativo.

**\*Preparación del Medio Färhaeus**

Compuesto	Concentración final	
CaCl <sub>2</sub>	0.680 mM	
MgSO <sub>4</sub>	0.486 mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.734 mM	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.042 mM	
Citrato férrico	18.5 µM	
Trazas Gibson	MnZO <sub>4</sub>	12 µM
	ZnSO <sub>4</sub>	765.1 µM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46.25 µM
	CuSO <sub>4</sub>	320 µM
	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	38.8 µM

pH Final de 7

## **RESULTADOS**

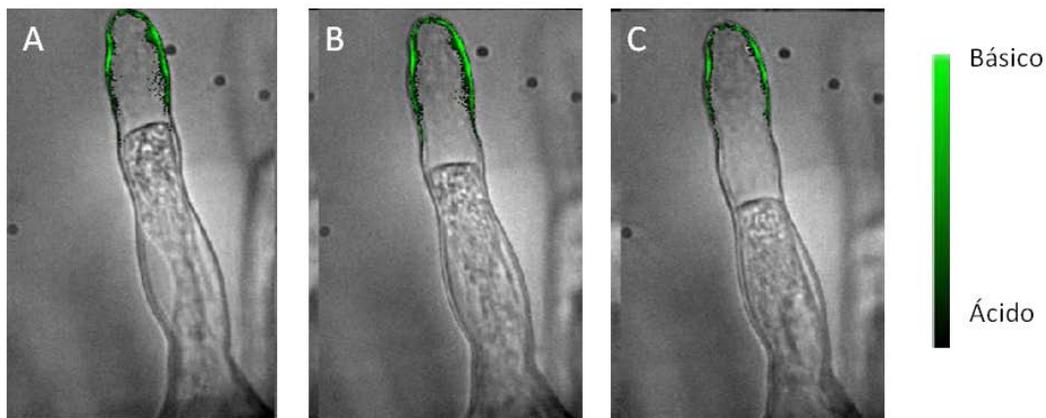
Inicialmente utilizamos el fluoróforo Oregon green-CBD para medir los cambios de pH en la pared celular, ya que su utilización en plantas se ha reportado en la literatura (Fasano, Swanson et al. 2001) y se quiso explorar si esta sonda sería adecuada para cumplir con los objetivos del proyecto. Inicialmente se determinó la concentración óptima del fluoróforo Oregon green-CBD. Esto comprende de manera general la concentración que permitiera tener una buena señal y que no interfiriera con el crecimiento normal de la célula. Esto tiene una gran relevancia ya que a concentraciones altas la sonda fluorescente tiende a inhibir el crecimiento. Lo siguiente fue realizar pruebas que permitieran determinar la eficiencia del fluoróforo Oregon green-CBD para determinar los cambios de pH en los pelos radicales de frijol.

### **Determinación de la concentración óptima de Oregon green-CBD y su localización en la pared celular**

Para poder visualizar los cambios de pH en los pelos radicales vivos es necesario determinar la concentración óptima del fluoróforo que nos permita observar los cambios en la fluorescencia sin alterar la morfología y el crecimiento celular del pelo radical. Se probaron diferentes concentraciones del fluoróforo Oregon green-CBD, estas fueron 1 mM, 0.5 mM y 0.2 mM concentración final en medio Färhaeus. Estos experimentos se llevaron a cabo en las placas de crecimiento diseñadas para este propósito en las cuales se mantiene la raíz del frijol en condiciones óptimas. Las concentraciones de 1 mM y 0.5 mM fueron descartadas debido a que bajo estas concentraciones los pelos radicales se plasmolizaban o la señal de fluorescencia era tan intensa que saturaba la cámara de CCD. Posteriormente se seleccionó una concentración de 0.2 mM debido a que en estas

condiciones la señal de fluorescencia era muy clara y podíamos observar las variaciones en los cambio pH en la pared celular. Por lo tanto esta concentración fue la utilizada para todos los experimentos posteriores.

Con la finalidad de determinar si la sonda fluorescente se incorporó a la pared celular y no inespecíficamente a otro sitio, se realizó un ensayo para corroborar la integración del fluoróforo en la pared celular. El pelo radical fue plasmolizado con 100  $\mu$ l de una solución de sacarosa al 20 % lo cual inmediatamente provocó la separación de la membrana celular de la pared celular, dejando ver que la señal de la fluorescencia se encuentra específicamente localizada en la pared celular, como se muestra en la figura 4.



**Figura 4. Localización del fluoróforo Oregon green-CBD en la pared celular de un pelo radical de frijol plasmolizado.** Imágenes sobrepuestas de luz transmitida con la correspondiente imagen de fluorescencia de un pelo radical de frijol. El pelo radical fue tratado con una solución de sacarosa al 20 % para inducir plasmólisis celular. A-C) Secuencia de imágenes sobrepuestas de luz transmitida con su fluorescencia correspondiente de un pelo radical de frijol con diferentes niveles de retracción de la membrana. En esta secuencia se puede observar que la fluorescencia se localiza específicamente en la pared celular. El color verde de la imagen corresponde a la señal de fluorescencia y las diferentes intensidades distintos niveles de pH. Imágenes tomadas con un objetivo 60x de inmersión en agua a intervalos de 5 segundos (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=3$ .

## **Respuesta del Oregon green-CBD a diferentes condiciones de pH para evaluar su sensibilidad a estos cambios en el medio de cultivo**

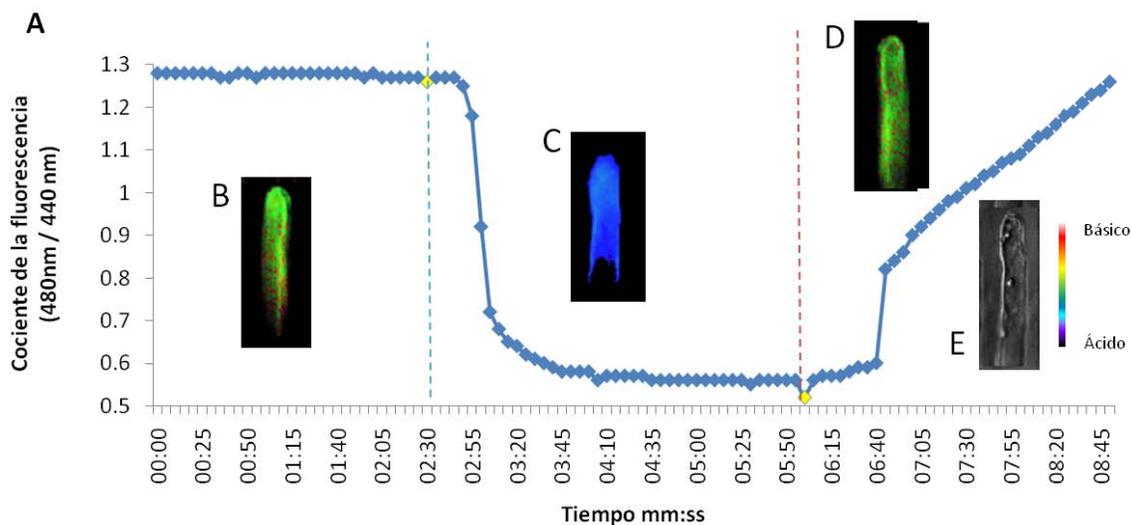
### Acidez

Se realizaron pruebas de la respuesta de la sonda Oregon green-CBD a pH ácidos mediante la aplicación de 100 µl de ácido ascórbico al 0.5 M en el medio de cultivo. Bajo estas condiciones, se observó una respuesta 10 segundos después de la aplicación, como se muestra en la figura 5, en donde el pH se acidificó de manera rápida en los pelos radicales vivos de *Phaseolus vulgaris*.

### Basicidad

Se realizaron pruebas de la respuesta del fluoróforo Oregon green-CBD en condiciones de pH básico mediante la aplicación de 100 µl de hidróxido de potasio al 0.5 M en el medio de cultivo. La respuesta se dio dentro de los primeros 10 segundos después de la aplicación, como se muestra en la figura 5. Los valores de la fluorescencia se elevaron de manera casi inmediata al adicionar la base en el medio Färhaeus a la raíz de la plántula de frijol, indicando que el pH de la pared celular experimentó una alcalinización.

## Respuesta del fluoróforo Oregon green-CBD a condiciones ácidas y básicas



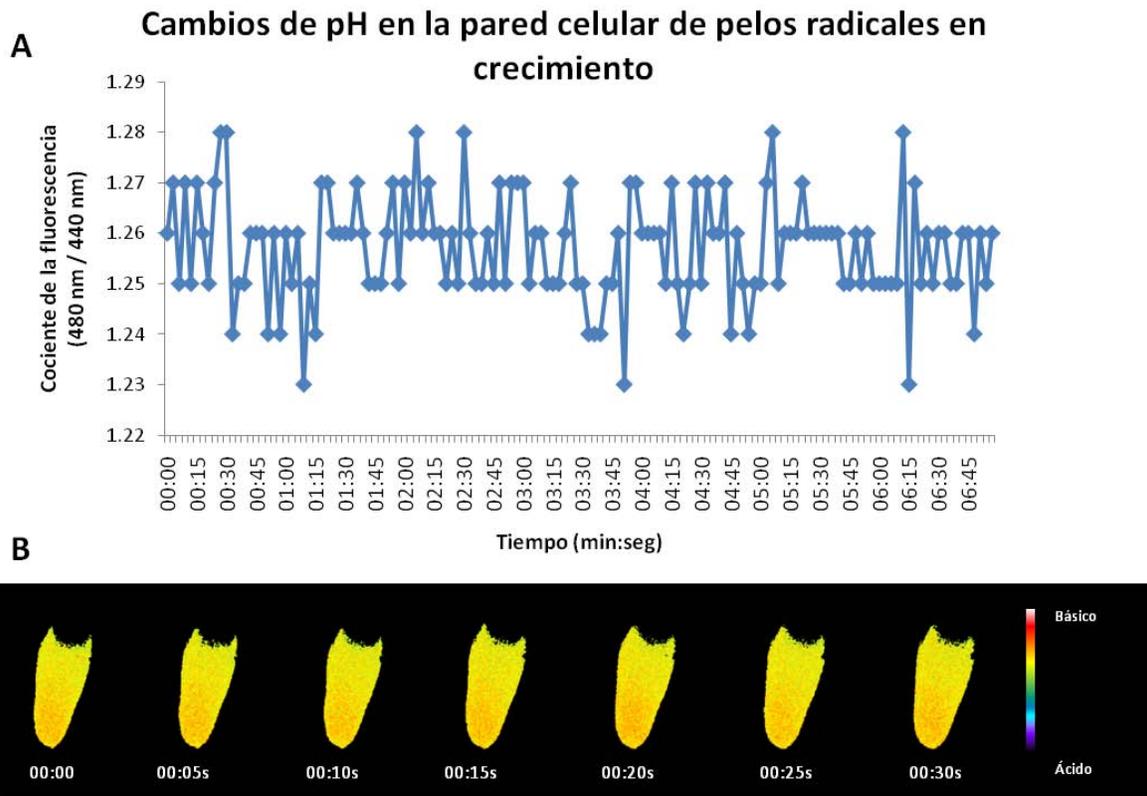
**Figura 5. Cambios de la fluorescencia de un pelo radical de frijol en respuesta a soluciones ácidas y básicas.** A) Gráfica que muestra los cambios de la fluorescencia registrada en un pelo radical de frijol de dos días de germinado utilizando el fluoróforo Oregon green-CBD y sometido a diferentes condiciones de pH. B) Imagen de la fluorescencia en condiciones de crecimiento normales, los valores se encuentran graficados en la parte superior de la imagen. La línea punteada azul indica el momento de la aplicación de 100  $\mu$ l de ácido ascórbico a 0.5 M. C) Imagen de fluorescencia después de la aplicación del ácido, como se puede observar los valores de la fluorescencia disminuyen, indicativo de que el pH en la pared celular ha disminuido. La línea punteada roja indica el momento de la aplicación de 100  $\mu$ l de hidróxido de potasio a 0.5 M. D) Imagen de fluorescencia de la respuesta a la aplicación de la base, se puede observar que los valores de la fluorescencia se elevan indicando un aumento en el pH. E) Imagen de luz transmitida del pelo radical de frijol que fue tratado como se describe. El color verde de la imagen corresponde a un pH alcalino y el color azul corresponde a un pH ácido de acuerdo a la escala de colores. Las imágenes se tomaron con un objetivo 60x de inmersión en agua a intervalos de 5 segundos. (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen, Philadelphia),  $n=5$ .

### **Visualización de los cambios de pH en la pared celular de los pelos radicales vivos en condiciones de crecimiento normal**

Para este propósito se utilizaron plántulas de frijol de dos días, tratados con la sonda fluorescente Oregon green-CBD. Posteriormente, los pelos radicales se visualizaron por microscopía de fluorescencia y se adquirieron secuencias de imágenes del pelo radical vivo. Esto nos permitió visualizar los cambios de pH en la pared celular bajo condiciones de crecimiento normales. Como se muestra en la figura 6, los cambios en fluorescencia se localizan particularmente en el ápice de la célula donde ocurre la elongación y el crecimiento polar. Los resultados obtenidos permiten sugerir que los cambios en pH son altamente dinámicos, es decir que estos valores cambian de un poco ácido a más alcalino.

### **Valoración del potencial de la fluoresceína acoplado a un dextrano y rodamina como sensor cuantitativo de cambios de pH**

Esta técnica se implementó debido a que no existen reportes al respecto sobre el empleo de esta sonda fluorescente en células vegetales y debido a que también se encuentra acoplado a la rodamina permite realizar mediciones cuantitativas. Una de las grandes ventajas de esta sonda es que el dextrano no permite la internalización de la sonda fluorescente por lo que permite realizar mediciones en la proximidad de la pared celular en los pelos radicales. Debido a que el colorante no se internaliza permite realizar mediciones durante largos periodos de tiempo.



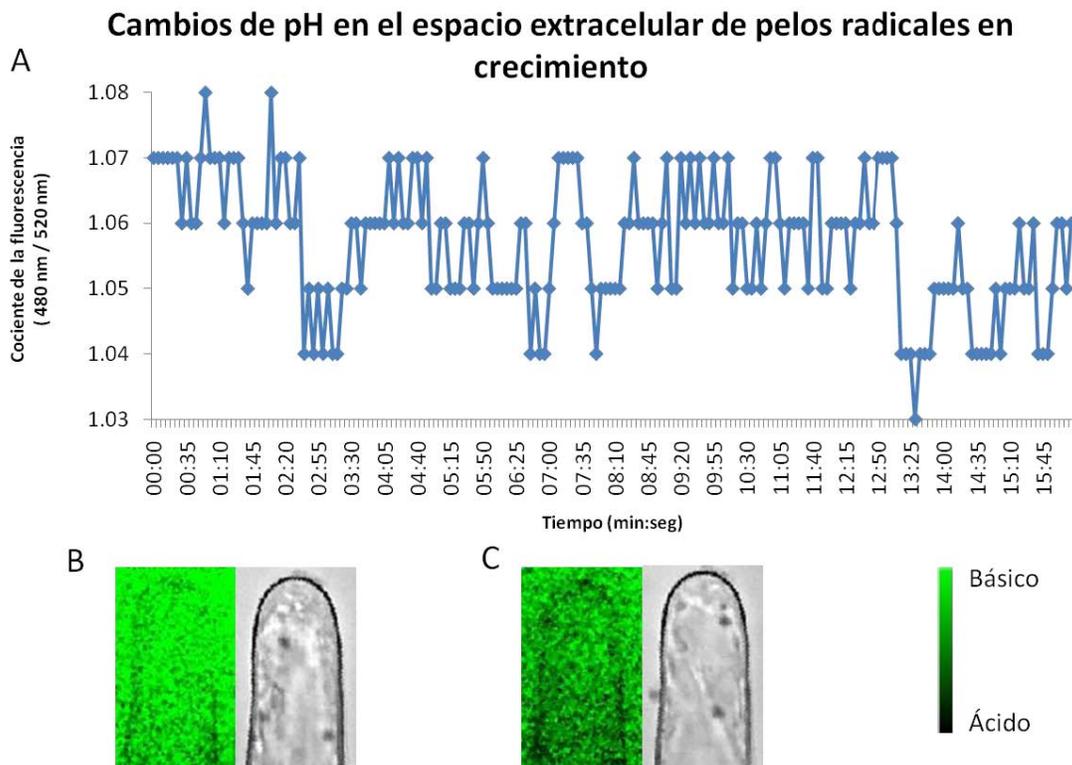
**Figura 6. Cambios de pH en la pared celular de un pelo radical vivo en condiciones de crecimiento utilizando la sonda fluorescente Oregon green-CBD.** A) Gráfica que muestra los cambios de la fluorescencia en la pared celular de un pelo radical de frijol en condiciones normales de crecimiento. B) Secuencia de imágenes representativas que muestran los cambios de pH en un pelo radical de frijol de dos días de germinado. Es importante notar que se trata de una célula viva bajo condiciones normales de crecimiento apical. En el ápice de la célula existen cambios claros en los valores de la fluorescencia y por lo tanto de pH. Imágenes tomadas con un objetivo 60x de inmersión en agua a intervalos de 5 segundos. (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=4$ .

### **Determinación de la concentración óptima de la sonda fluoresceína-dextrano-rodamina (FDR)**

Para utilizar el fluoróforo FDR es necesario que se encuentre homogenizado en el medio. Debido a que este fluoróforo no se localiza en alguna región específica de la célula sino que se encuentra difundido en el medio, fue necesario establecer la concentración óptima así como varias técnicas de aplicación. Se ensayaron 0.4, 0.8, 1.6 y 4 ng/ml en placas de observación con o sin fitagel (Sigma), esto es medio líquido o sólido, respectivamente. El fitagel en el medio de crecimiento es un tensoactivo no iónico que se utiliza para formar una película sólida en el cubreobjetos de las placas de observación que a su vez nos permite mantener a la radícula fija o anclada al medio. Después de varios ensayos se encontró que la concentración de 4 ng/ml del conjugado FDR en medio líquido funcionó bien y de manera general la fluorescencia se puede percibir mejor que en el medio sólido. Por lo tanto seleccionamos estas condiciones para realizar nuestros experimentos.

### **Visualización de los cambios de pH en el espacio extracelular en condiciones de crecimiento normal con la sonda FDR**

Las plántulas de dos días de germinación de *Phaseolus vulgaris* fueron tratadas con la sonda fluorescente FDR. Como se muestra en la figura 7 A, hay una variación en el pH apoplástico; en donde se observan periodos de alcalinización como se muestra en la figura 7 B y periodos de acidificación como se muestra en el panel 7 C. Nótese que los cambios se observan en la vecindad de la pared celular y que se identifican como cambios en el medio extracelular o la superficie de la célula.



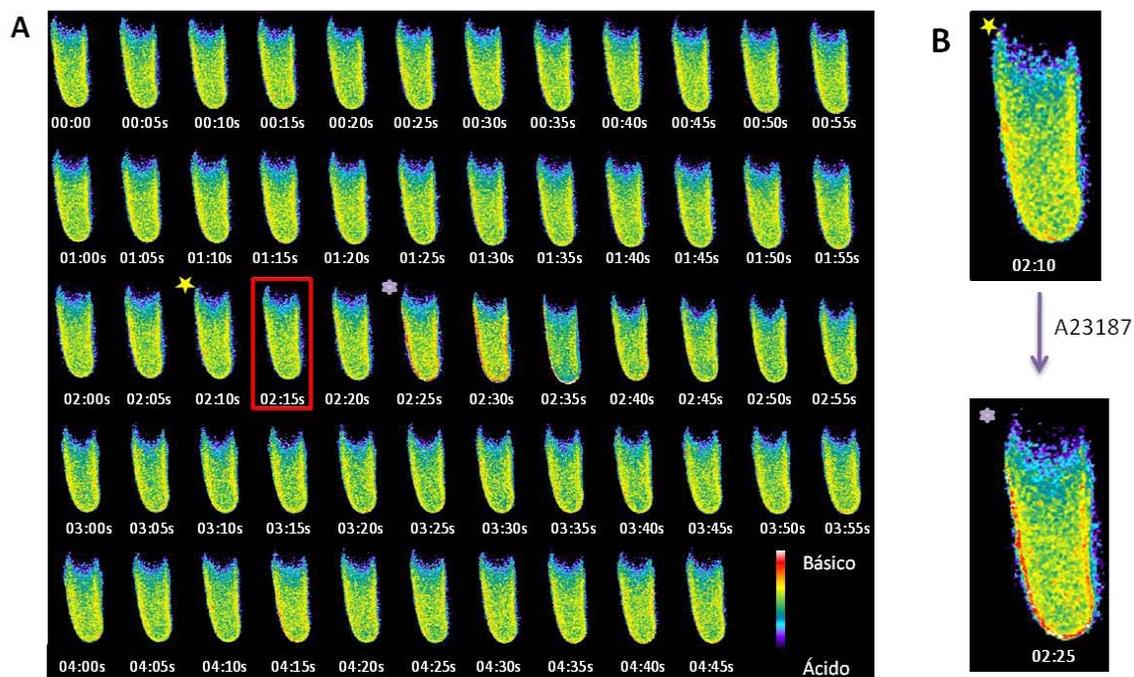
**Figura 7. Cambios de pH en la pared celular de un pelo radical en condiciones de crecimiento normales utilizando el fluoróforo FDR.** A) Gráfica de los cambios de fluorescencia en el espacio extracelular de un pelo radical de frijol de dos días de germinación en condiciones normales de crecimiento. B) Imágenes de fluorescencia y de luz transmitida de un pelo radical de frijol en condiciones de alcalinización. C) Imágenes de fluorescencia y de luz transmitida de un pelo radical de frijol en condiciones de acidificación. El color verde de la imagen corresponde a un pH más alcalino y el color negro corresponde a un pH más ácido de acuerdo a la escala de referencia. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 60x de inmersión en agua a un intervalo de 5 segundos. (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=3$ .

## **Visualización de los cambios de pH en la pared celular en respuesta al influjo de $\text{Ca}^{2+}$**

Un ionóforo es una pequeña molécula hidrofóbica que se incorpora en la bicapa lipídica y aumenta la permeabilidad de determinados iones, entre ellos el  $\text{Ca}^{2+}$ . El ionóforo A23187 por ejemplo se ha utilizado ampliamente para inducir influjos de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células vegetales a una concentración 40  $\mu\text{M}$  (Monshausen, Messerli et al. 2008; Monshausen, Bibikova et al. 2009). Además, se ha empleado como un control importante para el estudio de diversas respuestas que dependen de aumentos del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares como la apertura y el cierre de estomas (Allen, Chu et al. 2001).

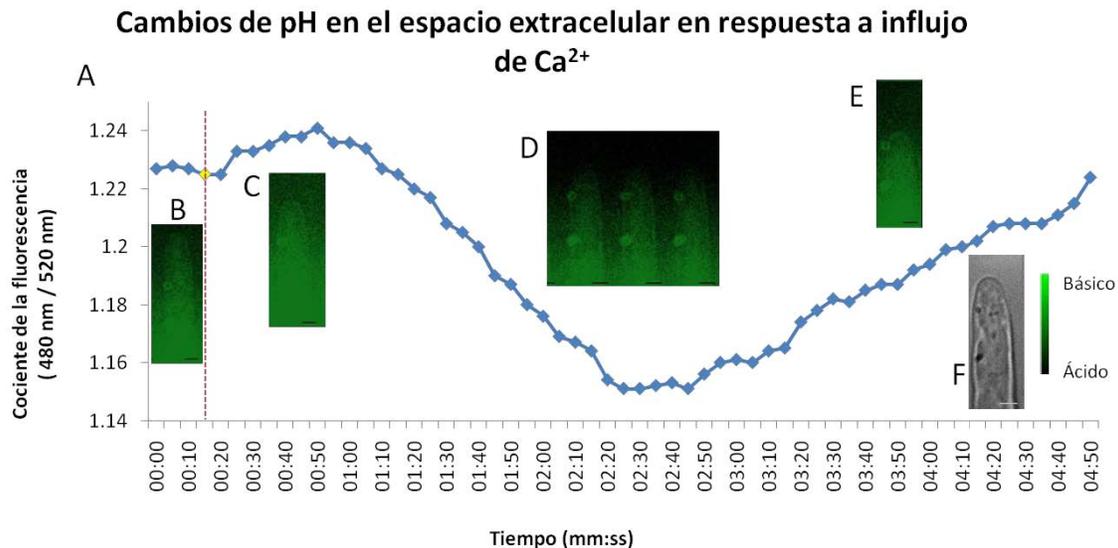
Se sabe que los influjos de  $\text{Ca}^{2+}$  provocan cambios en las actividades de la célula, esto debido en gran medida a que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero de gran importancia con múltiples funciones, como por ejemplo, la modulación de proteínas entre ellas la bomba de protones de la membrana plasmática (Kinoshita, Nishimura et al. 1995; Lino, Baizabal-Aguirre et al. 1998; Monshausen, Bibikova et al. 2009).

En la figura 8 se muestra una secuencia de imágenes de fluorescencia de un pelo radical de frijol de dos días de germinado y tratado con la sonda Oregon green-CBD. Esta célula marcada con la sonda fluorescente fue sometida al tratamiento del ionóforo A23187 a una concentración final de 40  $\mu\text{M}$ . Los resultados demuestran que inmediatamente después de la aplicación del ionóforo se produce un incremento de la fluorescencia en el ápice del pelo radical. Este aumento de la fluorescencia se interpreta como un incremento en los niveles de pH. Este incremento se puede ver en la pared celular pocos segundos después de la aplicación del tratamiento y nos sugiere fuertemente que los niveles de pH en la pared celular dependen en gran medida de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 8. Cambios de pH en la pared celular en respuesta al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando el fluoróforo Oregon green-CBD.** A) Secuencia de imágenes de fluorescencia de un pelo radical de frijol después de dos días de germinación en respuesta al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por la aplicación de  $40 \mu\text{M}$  concentración final del ionóforo A23187. La imagen del recuadro rojo indica el momento de la aplicación del tratamiento. B) Ampliación de imágenes del panel A. La imagen superior corresponde a la condición previa al tratamiento, la cual se encuentra marcada con una estrella amarilla en el panel A. La imagen inferior corresponde a 10 segundos después del tratamiento con el ionóforo, la cual se encuentra marcada con un asterisco lila en el panel A. En la imagen inferior se puede observar que existe una alcalinización representada por el color rojo en la pared celular que corresponde a un pH más alcalino de acuerdo a la escala de colores. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 60x de inmersión en agua a intervalos de 5 segundos. (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=6$ .

Como se observa en el resultado anterior, la inducción del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  produce alcalinización inmediata del apoplasto. Realizamos el mismo experimento pero ahora utilizando la sonda FDR, los resultados se muestran en la figura 9. En esta figura se observa de manera interesante el mismo resultado después de la aplicación del ionóforo, es decir una inmediata alcalinización de la pared celular. Sin embargo, posteriormente se observa una acidificación del medio extracelular que rodea la pared celular. Es probable que esta acidificación se deba a que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induzca una despolarización de la membrana mediante la apertura y cierre de canales y que la bomba de protones esté involucrada en la recuperación del potencial de membrana, se active generando una acidificación apoplástica.

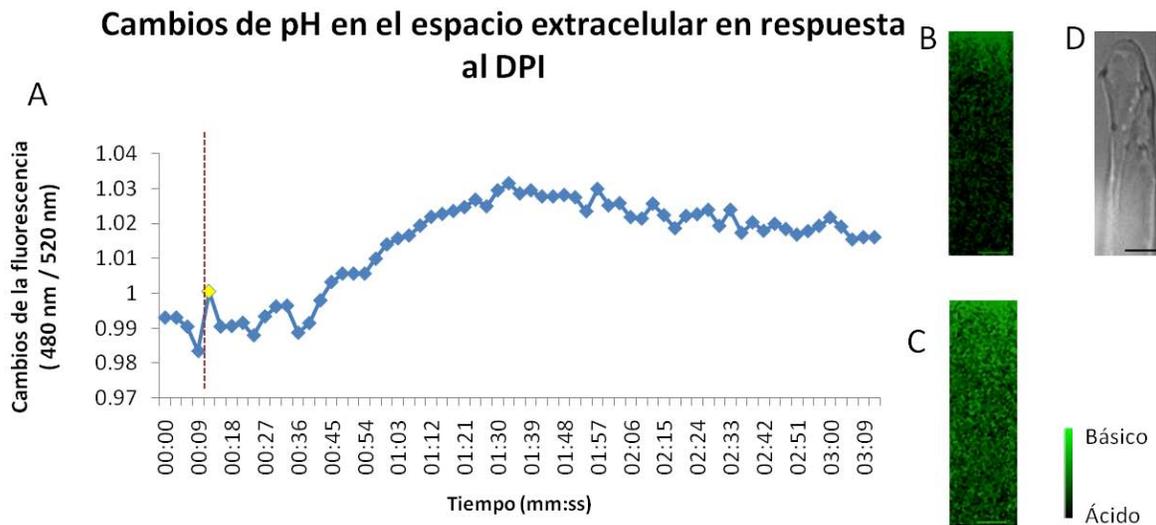


**Figura 9. Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta al ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187.** A) Gráfica de los cambios de fluorescencia en un pelo radical de frijol de dos días de germinado marcados con la sonda FDR y posteriormente tratados con 40  $\mu\text{M}$  concentración final del ionóforo A23187. La línea roja punteada indica el momento de la aplicación del tratamiento. B) Imagen de fluorescencia antes del tratamiento. C) Imagen de fluorescencia después del tratamiento donde se observa una alcalinización inmediata. D) Imágenes de fluorescencia después de la alcalinización inicial donde se observa ver que el espacio extracelular se acidifica. E) Imágenes de fluorescencia después de la acidificación el pH parece retornar a sus niveles iniciales. F) Imagen de luz transmitida del pelo radical de frijol al cual se le realizó el tratamiento antes descrito. El color verde de la imagen corresponde a un pH alcalino y el color negro corresponde a un pH ácido, de acuerdo a la barra de colores. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 60x de inmersión de agua a un intervalo de 5 segundos (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=3$ . Escala 5  $\mu\text{m}$ .

## **Visualización de los cambios de pH en el apoplasto en respuesta a la inhibición de la producción de EOR apoplástico**

Las especies de oxígeno reactivas desempeñan un papel importante en el proceso de crecimiento apical de células polarizadas como es el caso de los pelos radicales, hifas de hongos y tubos polínicos (Cardenas 2009). En estudios previamente realizados por Monshausen y col. en el 2007 reportó que la reducción de la producción de EOR por la mutación de una NADPH oxidasa detiene el crecimiento apical de los pelos radicales de *Arabidopsis thaliana*. El fenotipo observado se puede recuperar modificando las condiciones de pH del medio de cultivo (Monshausen, Bibikova et al. 2007). Los datos demuestran la importancia de los niveles de EOR en el apoplasto en el mantenimiento del crecimiento apical de los pelos radicales y su probable relación con la bomba de protones.

En la figura 10 observamos una secuencia de imágenes de fluorescencia de un pelo radical de frijol de dos días de germinado, pre-incubado con FDR y en presencia del inhibidor DPI a una concentración de 40  $\mu$ M, concentración reportada como efectiva para inhibir a las NADPH oxidasas de membrana (Cardenas and Quinto 2008). Se puede observar que después de unos segundos de la aplicación del DPI hay un incremento del pH de la pared celular.

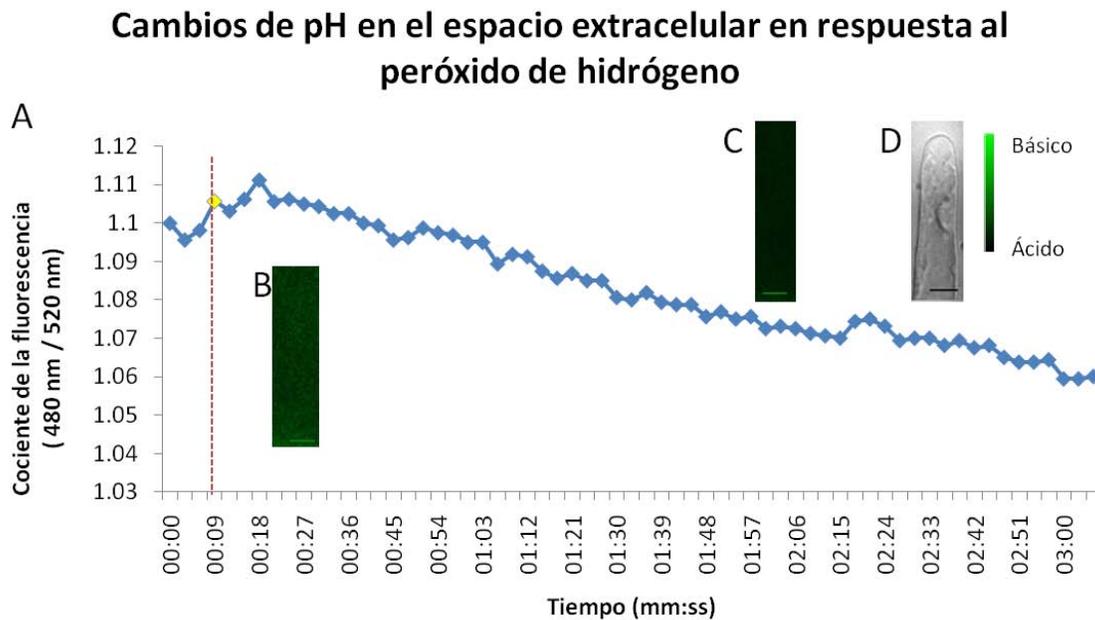


**Figura 10. Cambio de pH en el espacio extracelular en respuesta a la aplicación del DPI.** A) Gráfica de los cambios de pH representado como cambios en la fluorescencia de un pelo radical de frijol en respuestas a la inhibición de las NADPH oxidasas de membrana plasmática con 50  $\mu$ M concentración final de DPI. La línea punteada indica el momento de la aplicación del tratamiento. B) Imagen de la fluorescencia observada antes de la aplicación del DPI. C) Imagen de la fluorescencia observada después del tratamiento con DPI. Se observa que los valores de la fluorescencia se incrementaron, lo cual sugiere un aumento en el pH del medio extracelular en presencia del DPI. D) Imagen de luz transmitida representativa del pelo radical de frijol al cual se le realizó el tratamiento descrito. El color verde de la imagen corresponde a un pH alcalino y el color negro corresponde a un pH ácido, de acuerdo a la barra de referencia. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 60x de inmersión en agua a un intervalo de 3 segundos. (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=4$ . Escala 5  $\mu$ m.

## **Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta al peróxido de hidrógeno y quitosano**

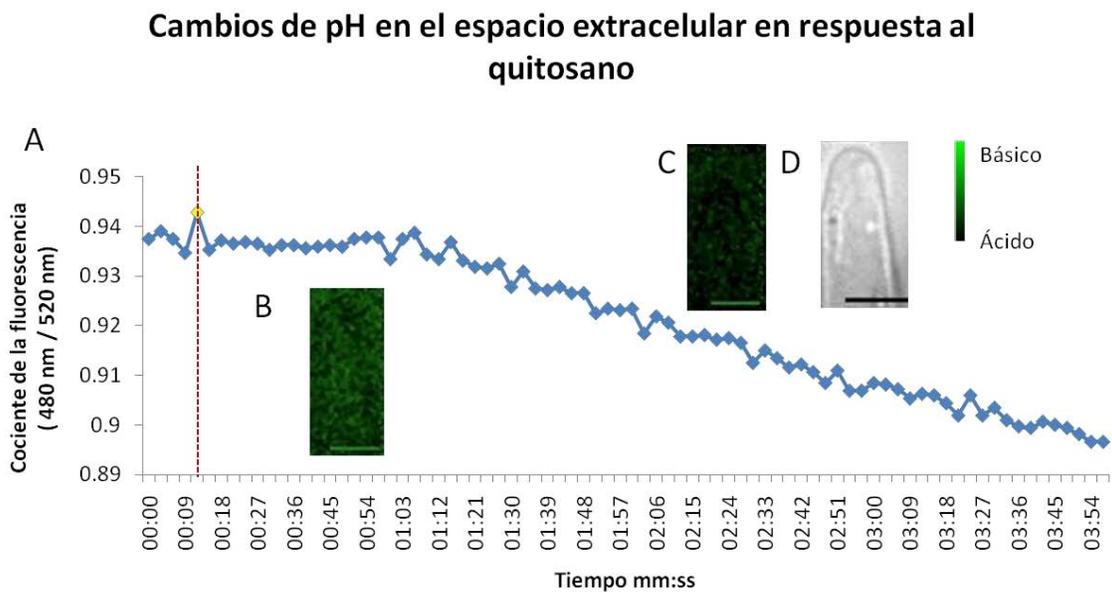
Como se demostró en los resultados antes descritos, la inhibición de las NADPH oxidasas resulta en la alcalinización del apoplasto, estos datos sugieren que probablemente EOR esté modulando la bomba de protones y contribuya al mantenimiento de las condiciones de pH de la pared celular. El hecho de que la acidificación del medio extracelular en el proceso de crecimiento normal de los pelos radicales se vea afectado por la inhibición de la enzima que produce EOR y que éste también sea un elemento importante en el mantenimiento del crecimiento apical sugiere la existencia de un fino mecanismo de regulación de ambos factores, tanto en el tiempo como en el espacio.

Para corroborar los resultados antes descritos se realizaron experimentos que consistieron en aplicar directamente 40  $\mu\text{M}$  concentración final de peróxido de hidrógeno como especie de oxígeno reactiva. Como se observa en la figura 11, después de la aplicación del peróxido se produce una rápida alcalinización seguida de una prolongada acidificación del medio extracelular. Estos datos sugieren que el efecto de las especies de oxígeno reactivas sobre el pH de la pared celular está ampliamente relacionado y que esto repercute sin duda alguna sobre las propiedades de crecimiento de la célula. De hecho, las mutantes en la NADPH oxidasa de *Arabidopsis* también pueden ser rescatadas fenotípicamente por la adición de peróxido de hidrógeno (Monshausen, Bibikova et al. 2007).



**Figura 11. Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta a peróxido de hidrógeno.** A) Gráfica de los valores de fluorescencia en un pelo radical de frijol de dos días de germinado en respuestas a la aplicación de 40 $\mu$ M concentración final de peróxido de hidrógeno. La línea roja punteada indica el momento de la aplicación del tratamiento. B) Imagen de fluorescencia antes del tratamiento. C) Imagen de fluorescencia después del tratamiento con peróxido. Nótese que el medio extracelular se acidifica cuando se adiciona peróxido en el medio. D) Imagen de luz transmitida del pelo radical de frijol al cual se le realizó el tratamiento descrito. El color verde de la imagen corresponde a un pH alcalino y el color negro corresponde a un pH ácido, de acuerdo a la barra de referencia. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 60x de inmersión en agua a un intervalo de 3 segundos (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=3$ . Escala 5  $\mu$ m.

Otra forma de poder estudiar la participación de EOR en los cambios de pH del medio extracelular es la aplicación de quitosano como inductor de la producción de las especies de oxígeno reactivas. Lo que se puede observar en la figura 12, es la acidificación del medio extracelular en respuesta a la aplicación del quitosano. Esto sugiere que las especies de oxígeno reactivas contribuyen a la activación de la bomba de protones, lo cual acidificaría el espacio extracelular del pelo radical en crecimiento.

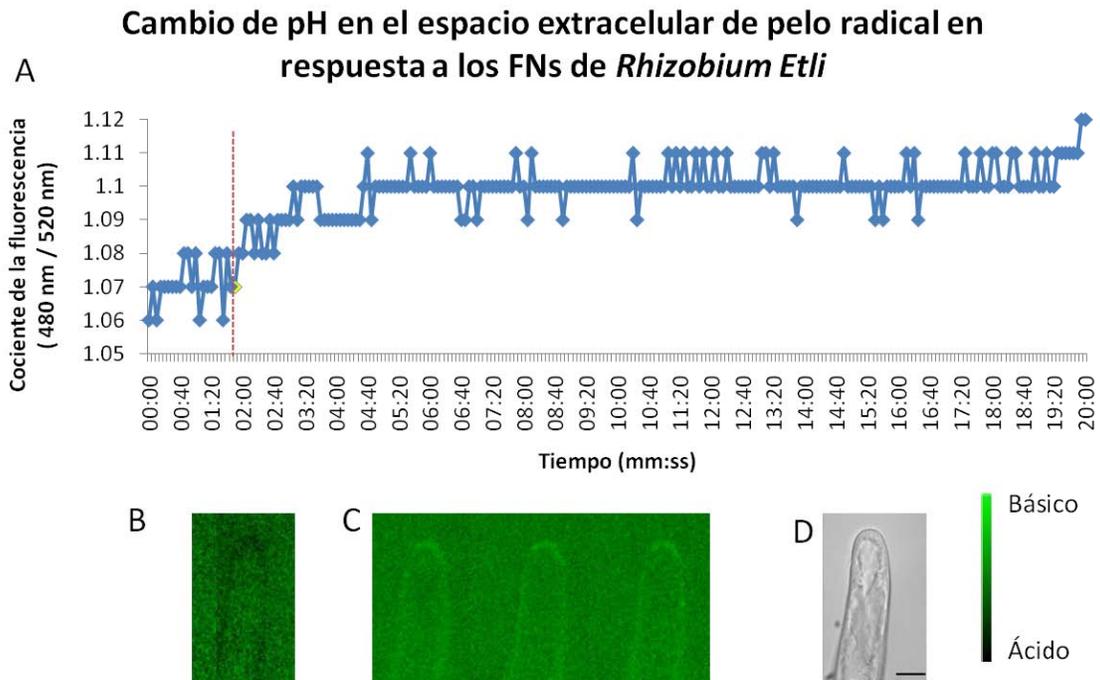


**Figura 12. Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta al quitosano.** A) Gráfica de los cambios de fluorescencia en un pelo radical de frijol de dos días de germinado en respuestas a la aplicación de 40  $\mu$ M concentración final de quitosano. La línea roja punteada indica el momento de la aplicación del tratamiento. B) Imagen del pelo radical ilustrando la fluorescencia presentada antes del tratamiento. C) Imagen de la fluorescencia después del tratamiento con quitosano. Se observa que el medio extracelular se acidifica en respuesta al quitosano. D) Imagen de luz transmitida del pelo radical de frijol al cual se le realizó el tratamiento descrito. El color verde de la imagen corresponde a un pH alcalino y el color negro corresponde a un pH ácido, de acuerdo a la barra de referencia. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 60x de inmersión en agua a un intervalo de 3 segundos. (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=3$ . Escala 5  $\mu$ m.

### **Visualización de los cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta a los FNs de *Rhizobium etli***

En la simbiosis sabemos que los FNs producidos por las rizobias tienen un papel esencial en las primeras etapas de la interacción planta-bacteria. Estos factores son las moléculas señales que inducen en el pelo radical cambios morfológicos que dependen de modificaciones estructurales de la pared celular para poder permitir el encorvamiento y establecimiento del hilo de infección.

En la figura 13 A, se muestra la gráfica de los cambios de pH del apoplasto en respuesta a la aplicación de los FNs de *Rhizobium etli* a una concentración final de 10 nM en un pelo radical de frijol. Estas células bajo condiciones normales de crecimiento y previo a la aplicación de los FNs presenta un pH ligeramente ácido en la región apical, similar a los descritos en la figura 7. En el momento de la aplicación de los FNs se produce una alcalinización inmediata en la pared celular de la región apical; esta alcalinización se mantiene constante después de algunos minutos.



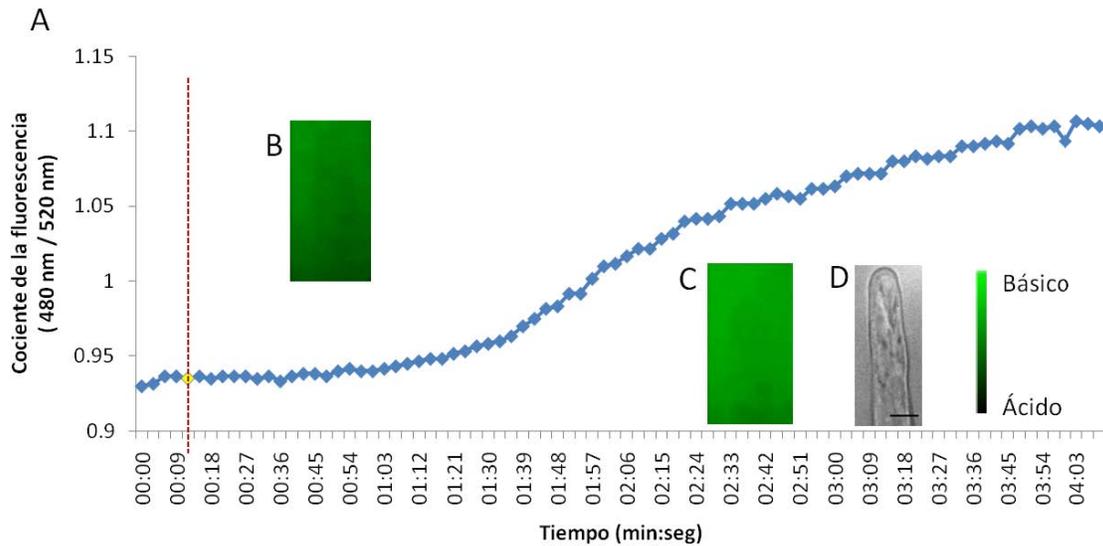
**Figura 13. Cambios de pH en el espacio extracelular de un pelo radical de frijol en respuesta a la aplicación de los FNs de *Rhizobium etli*.** A) Gráfica de los valores de la fluorescencia en un pelo radical de frijol después de dos días de germinación en respuesta a la aplicación de los FNs de *Rhizobium etli* a 10 nM concentración final. La línea roja punteada marca el momento de la aplicación. B) Imagen de fluorescencia de un pelo radical de frijol antes del tratamiento con los FNs. C) Imagen de fluorescencia de un pelo radical de frijol después del tratamiento con los FNs. Nótese el incremento en los valores de la fluorescencia en respuesta a la aplicación de los FNs, estos datos sugieren que el pH extracelular ligeramente se alcaliniza. El color verde de la imagen corresponde a un pH alcalino y el color negro corresponde a un pH ácido, de acuerdo a la barra de referencia. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 60x de inmersión en agua a un intervalo de 5 segundos (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=4$ .

## **Visualización de los cambios de pH en respuesta a la aplicación de un inhibidor de la bomba de protones de la membrana plasmática**

Con la finalidad de determinar cómo la bomba de protones contribuye a los cambios de pH en la pared celular, realizamos experimentos que nos permitiera inhibir a la bomba de protones y poder visualizar los cambios del pH en el espacio extracelular en respuesta a la inhibición de esta proteína. El compuesto que utilizamos fue el vanadato de sodio, el cual se reportado ampliamente en la literatura como inhibidor de la bomba de protones de membrana plasmática a la concentración de 75  $\mu\text{M}$  (Amoroso, Clarke et al.).

En la figura 14 se puede observar el resultado obtenido después de la aplicación del vanadato de sodio en un pelo radical, estos resultados se describen como una inmediata alcalinización del espacio extracelular. Esto debido a que la bomba de protones se encuentra inhibida y no es posible el transporte de protones al medio extracelular.

### Cambios de pH en respuesta al vanadato de sodio



**Figura 14. Cambios de pH en el espacio extracelular en respuesta al inhibidor de la bomba de protones de membrana plasmática.** A) Gráfica que muestra los cambios de la fluorescencia en un pelo radical de frijol en respuesta a la aplicación de vanadato de sodio a una concentración final de  $75\mu\text{M}$ . La línea roja punteada indica el momento de la aplicación del tratamiento. B) Imágenes de la fluorescencia antes del tratamiento. C) Imágenes de la fluorescencia después del tratamiento. Nótese que el medio extracelular se alcaliniza cuando se inhibe a la bomba de protones. D) Imagen de luz transmitida del pelo radical de frijol al cual se le realizó el tratamiento descrito. La barra de escala en el panel D representa  $30\mu\text{m}$ . El color verde de la imagen corresponde a un pH alcalino y el color negro corresponde a un pH ácido, de acuerdo a la barra de referencia. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de  $60\times$  y de inmersión en agua a un intervalo de 3 segundos. (MetaFluor/Methamorph, Universal Imagen),  $n=3$ .

## DISCUSIÓN

La elongación de las células vegetales depende de varios factores, tales como la turgencia, la disposición de los componentes básicos que permiten la síntesis de la pared celular y las modificaciones fisicoquímicas de ésta, las cuales se han apoyado en gran medida por la teoría del crecimiento ácido. Esta teoría sugiere que el decremento en el pH apoplástico, producido por una  $H^+$  ATPasa de la membrana plasmática. Esta acidificación extracelular activa enzimas apoplásticas y modifica proteínas estructurales que facilitan la incorporación de material para sintetizar nueva pared celular y permitir la elongación celular. (Gaxiola, Palmgren et al. 2007; Duby and Boutry 2009).

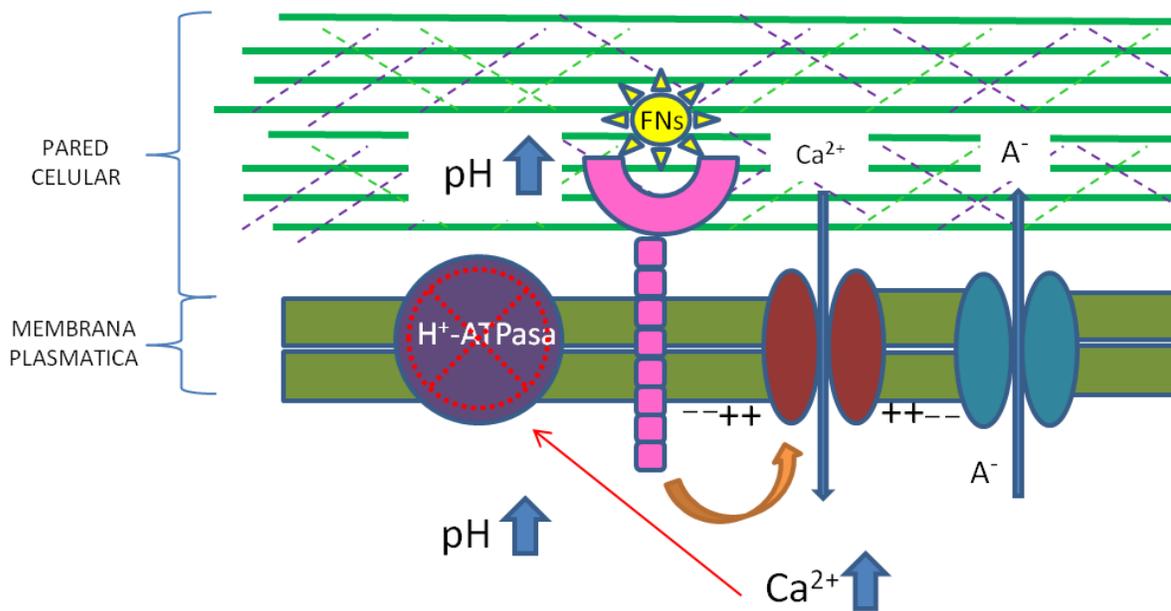
Como se sabe la pared celular es una red de microfibrillas de celulosa que se encuentra embebida en una matriz hidratada compuesta por pectina y otras proteínas. Durante el proceso de crecimiento celular las modificaciones de las interacciones glucosídicas y las proteínas en la pared, así como la presión de turgencia que se deriva de la entrada de agua a la célula mediante las acuaporinas, promueven en conjunto la expansión celular. Los pelos radicales son células que presentan un crecimiento altamente polarizado y oscilatorio. En estas células la coordinación del crecimiento en un área determinada está regulada por múltiples factores que permiten o hacen posible esta polaridad. Dentro de los factores que permiten esta polarización podemos describir: los mecanismos de transducción de señales, influjo apical de  $Ca^{2+}$ , tráfico vesicular, producción de EOR, cambios de pH, organización del citoesqueleto, composición de lípidos, etc. (Carol and Dolan 2002). Estos procesos se han estudiado con diversas técnicas, pero una de las herramientas más utilizadas e innovadoras es la aplicación de fluoróforos para la visualización de todos estos eventos celulares con una resolución espacial y temporal *in vivo*.

Por medio de la utilización del fluoróforo NERF-Cl conjugado a un dextrano de 10 kDa. se han estudiado los cambios de pH apoplástico en el proceso de iniciación de los pelos

radicales (Bibikova, Jacob et al. 1998). Con este fluoróforo se ha logrado definir que el sitio de iniciación del pelo radical es dependiente de la acidificación de su pared celular. Una vez que se ha establecido el crecimiento polarizado del pelo radical, la pared celular se alcaliniza y posteriormente se empieza a generar un crecimiento oscilatorio con periodos de crecimiento largos y cortos, muy similar al patrón que presentan otras células con crecimiento polar como los tubos polínicos y las hifas de los hongos (Bibikova, Jacob et al. 1998). Por otro lado, la acidificación y alcalinización en la región de crecimiento se coordinan de manera oscilatoria al igual que el  $\text{Ca}^{2+}$  y los niveles intracelulares de EOR (Monshausen, Bibikova et al. 2007).

El interés de este proyecto se centra en el proceso simbiótico que se establece entre las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium*. Uno de los pasos importantes para el establecimiento de la simbiosis es la interacción física entre ambos simbioses y las respuestas que estos desencadenan. Generalmente la bacteria debe inducir en los pelos radicales cambios morfológicos que permiten la formación del hilo de infección, los cuales son estructuras que utiliza la bacteria para poder internalizarse en las células de la planta huésped. Los FNs, son las moléculas específicas producidas por las rizobias que interactúan con la planta hospedera, esta molécula señal produce una serie de cambios en los pelos radicales, tales como: re-arreglo del citoesqueleto, influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros iones, producción de EOR, alcalinización citoplásmica (Felle 1996; Cardenas, Feijo et al. 1999; Downie and Walker 1999; Cosgrove 2000; Cardenas, Thomas-Oates et al. 2003; Cardenas and Quinto 2008). Esta alcalinización citoplásmica que se ha descrito en respuesta a los FNs es rápida y sugiere que probablemente tenga un efecto sobre el apoplasto, el cual probablemente estaría acidificado. Sin embargo, los resultados obtenidos y que se muestran en la figura 9, demuestran que de manera inmediata a la aplicación de los FNs, el medio extracelular se alcaliniza. Esto es contrario a lo predicho, pero es muy probable que la inducción de la alcalinización apoplástica en respuesta a los FNs se encuentre modulando la síntesis de la pared celular y con esto inhibiendo el crecimiento del pelo radical.

En el modelo propuesto por Felle y col. en el 1996, se especulaba acerca de los cambios de pH en el apoplasto de los pelos radicales en respuesta a la alcalinización citoplásmica inducida por los FNs e indirectamente se sabía que el apoplasto se alcalinizaba; pero hasta la actualidad no hay reportes que lo demuestren. Utilizando sondas fluorescentes que responden a cambios de pH en el medio extracelular se ha podido visualizar los cambios de pH en el apoplasto de los pelos radicales en respuesta a los FNs, donde se verifico de manera directa que existe una alcalinización. Sugiriendo que la salida de protones del citoplasma al medio extracelular se encuentra disminuida o interrumpida (figura 15).



**Figura 15. Modelo propuesto de los cambios de pH en respuesta a los FNs.** La interacción simbiótica entre las plantas leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* ocurre mediante el intercambio de moléculas, donde la planta secreta compuestos de naturaleza flavonoide que induce en la bacteria la transcripción de genes esenciales para la nodulación (genes nod) y sus productos participan en la síntesis y liberación de los factores Nod. Estos son reconocidos específicamente por los pelos radicales y estimulan respuestas celulares como son: flujos de iones, acumulación de Ca<sup>2+</sup> en la región apical, transducción de señales, oscilaciones de calcio, organización del citoesqueleto, producción de EOR, alcalinización del citoplasma, entre otros. Se sabe que el incremento del Ca<sup>2+</sup> citoplásmico bloquea a la bomba de protones, por lo tanto, el influjo de Ca<sup>2+</sup> inducido por los FNs inhibe a la bomba de protones de la membrana plasmática provocando una alcalinización apoplástica. Esquema modificado de Felle *et al.*, 1996.

Los cambios de pH en el apoplasto se modifican de acuerdo a los estímulos percibidos, por ejemplo, cuando se enfrenta a un patógeno la acidificación de la pared promueve la activación de enzimas apoplásticas que ayudan en la protección de la misma (Felle, Kondorosi et al. 2000). En el proceso simbiótico, se sabe que el pelo radical debe desarrollar cambios morfológicos que permitan o faciliten el proceso de infección; la respuesta temprana ante el estímulo de los FNs es la alcalinización apoplástica, lo cual inhibiría inicialmente el crecimiento del pelo radical. Sin embargo, se sabe que posteriormente, después de dos horas de tratamiento con los FNs las células pueden reiniciar el crecimiento polar o después de 72 horas en presencia de la bacteria pueden iniciar la formación del hilo de infección.

En estudios realizados en extractos celulares de hoja de tabaco, se descubrió un péptido que induce en células en suspensión una alcalinización apoplástica, este péptido fue llamado “Rapid Alkalinization Factor” (RALF), por sus siglas en inglés. Se observó que este péptido inhibe de manera importante el desarrollo y el crecimiento celular, además de inducir influjos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pearce, Moura et al. 2001; Haruta and Constabel 2003). Este factor se ha estudiado en *Arabidopsis thaliana*, en los tubos polínicos de *Solanum lycopersicum* y en pelos radicales de *Nicotiana tabacco* y *Medicago truncatula* (Covey, Subbaiah et al.; Pearce, Yamaguchi et al.; Haruta, Monshausen et al. 2008). En este último modelo, Combier y col. en el 2008 estudiaron la participación de este péptido en el proceso simbiótico, observando que la sobreexpresión de este gen afectaba la formación de hilos de infección y por lo tanto la nodulación (Combier JP 2008). Estos hallazgos nos permiten especular que este RALF podría estar participando en la respuesta que nosotros observamos, siendo interesante poder estudiar este péptido en nuestro modelo de estudio.

Se ha propuesto que los cambios de pH en la pared celular y la producción apoplástica de las especies de oxígeno reactivas tienen la capacidad de poder modular la expansión celular. Por ejemplo, las mutantes en una NADPH oxidasa (enzima generadora de EOR) de

membrana AtRBOH C en *Arabidopsis* muestra los inicios de formación de los pelos radicales, sin embargo no se elongan. A pesar de este fenotipo, la mutante puede ser rescatada cuando se crece a un pH ácido  $\approx 6$  y se puede observar nuevamente bajo estas condiciones el desarrollo de los pelos radicales (Foreman, Demidchik et al. 2003; Monshausen, Bibikova et al. 2007). Estos resultados han permitido sugerir que las EOR y las condiciones de pH en el apoplasto contribuyen al desarrollo de los pelos radicales.

Utilizando el fluoróforo FDR y el inhibidor de las NADPH oxidasas de membrana plasmática (DPI) pudimos observar *in vivo* lo que ocurre con el pH del apoplasto cuando existe la reducción de la producción de EOR, así podemos darnos una idea de cómo participan las especies de oxígeno reactivas en los cambios de pH apoplástico en respuesta a estímulos que las generen. Observamos que al momento de no generarse EOR en el apoplasto por la inhibición de las NADPH oxidasas de membrana, se produce una alcalinización inmediata. Posteriormente para observar directamente la respuesta del pelo radical a EOR, realizamos ensayos de aplicación directa de peróxido de hidrógeno y quitosano. El resultado de estos ensayos fue una acidificación apoplástica (figura 11 y 12). La presencia de esta acidificación al parecer prolongada, nos hace recordar la idea de que EOR participa en la acidificación del apoplasto posiblemente como activador de la bomba de protones como se ha sugerido (Monshausen, Bibikova et al. 2007; Monshausen, Bibikova et al. 2009) y participa en el crecimiento de los pelos radicales promoviendo la acidificación apoplástica (Amborabe, Bonmort et al. 2008).

Se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un ion que participa en muchas funciones celulares. En el caso de los pelos radicales se ha estudiado ampliamente que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  es un evento que participa de manera importante en la respuesta a la percepción de estímulos externos, en el establecimiento del proceso simbiótico, en la modulación del crecimiento polarizado (Cardenas, Feijo et al. 1999; Downie and Walker 1999; Cardenas, Holdaway-Clarke et al. 2000; Monshausen, Messerli et al. 2008; Cardenas 2009; Sieberer, Chabaud et al. 2009),

además de su participación en los cambios de pH en la pared celular (Monshausen, Bibikova et al. 2009).

En este trabajo estudiamos los cambios de pH en la pared celular en respuesta a un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Utilizando inicialmente como sonda el fluoróforo Oregon green-CBD, observamos que al momento de generar un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por el ionóforo A23187 existe una alcalinización apoplástica inmediata (figura 8). Esto es debido a que inicialmente los influjos de  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben a la bomba de protones de membrana plasmática (Kinoshita, Nishimura et al. 1995; Lino, Baizabal-Aguirre et al. 1998). Posteriormente utilizando fluoróforo FDR pudimos observar que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en un inicio genera la alcalinización inmediata del medio extracelular como anteriormente habíamos descrito, pasado unos segundos el medio extracelular se acidifica, indicio de que la bomba de protones de la membrana plasmática está activa (figura 9). Esto nos lleva a especular que el  $\text{Ca}^{2+}$  en un inicio inhibe a la bomba de protones generando así la alcalinización inmediata del apoplasto, pasado este estímulo se activa la bomba de protones para rectificar el potencial de membrana provocando la acidificación del espacio extracelular.

Es claro que señales que modifiquen los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ápice del pelo radical como el aumento en ERO pueden regular el pH de la pared celular. La generación de un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  es una respuesta común en las células que se encuentran bajo algún estímulo y con los resultados obtenidos en este trabajo se podría hipotetizar que: la alcalinización apoplástica inmediata que se presenta segundos después de provocar el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  es debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  por ser un ion con función de segundo mensajero, se encuentre inhibiendo la actividad de la bomba de protones de membrana generando una acidificación citoplasmática momentánea. Debido a que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  que nosotros inducimos no va acompañado de ninguna otra señal, este estímulo no llega a desencadenar una respuesta completa y pasado el influjo, la bomba de protones se vuelve a activar y trasloca al apoplasto los protones acumulados en el citoplasma, acidificando el medio.

## CONCLUSIONES

1. Los fluoróforos Oregon green-CBD y fluoresceína-dextrano-rodamina son una herramienta ideal para determinar los cambios de pH en la pared celular de los pelos radicales de *Phaseolus vulgaris in vivo*.
2. El pH en la pared celular de los pelos radicales de *Phaseolus vulgaris* es dinámico durante las condiciones normales de crecimiento.
3. Los FNs de *Rhizobium etli* inducen una alcalinización apoplástica en los pelos radicales de *Phaseolus vulgaris*.
4. El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la aplicación del ionóforo A23187 induce cambios en el pH de la pared celular.
5. El inhibidor de las NADPH oxidasas de membrana plasmática (DPI) induce una alcalinización de la pared celular.
6. El tratamiento con peróxido de hidrógeno induce una acidificación apoplástica en los pelos radicales.
7. La aplicación del quitosano como estímulo de la producción de las especies de oxígeno reactivas induce una acidificación apoplástica.
8. El inhibidor de la bomba de protones de la membrana plasmática (vanadato de sodio) induce una alcalinización del apoplasto.

## PERSPECTIVAS

- Utilizar una sonda fluorescente de pH intracelular para poder estudiar los cambios inducidos por los FNs.
- Diseñar alguna proteína recombinante la cual contenga un fluoróforo sensible a pH que permita estudiar los cambios de pH en el apoplasto en el proceso de elongación del hilo de infección en la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*.
- Estudiar las bombas de protones en el modelo de *Phaseolus vulgaris*
- Inmunolocalizar la bomba de protones para poder determinar donde se distribuye cuando se está desarrollando los hilos de infección
- Estudiar el péptido RALF en el modelo de estudio de *Phaseolus vulgaris* y ver su participación en el desarrollo de los pelos radicales y el proceso de simbiosis.

## BIBLIOGRAFIA

- Allen, G. J., S. P. Chu, et al. (2001). "A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements." Nature **411**(6841): 1053-7.
- Amborabe, B. E., J. Bonmort, et al. (2008). "Early events induced by chitosan on plant cells." J Exp Bot **59**(9): 2317-24.
- Amoroso, S., R. J. Clarke, et al. "Electrogenic plasma membrane H(+)-ATPase activity using voltage sensitive dyes." J Bioenerg Biomembr.
- Baluska, F., J. Salaj, et al. (2000). "Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges." Dev Biol **227**(2): 618-32.
- Bibikova, T. N., T. Jacob, et al. (1998). "Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in Arabidopsis thaliana." Development **125**(15): 2925-34.
- Brewin, N. J. (2004). "Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis." Critical Reviews in Plant Sciences **23**(4): 293–316.
- Buchanan B.B., G. W. a. j. R. L. (2000). Biochemistry & Molecular biology of plants A. S. o. P. P. editorial. **1**.
- Cardenas, L. (2009). "New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells." Plant Signal Behav **4**(1): 4-8.
- Cardenas, L., J. Dominguez, et al. (1995). "Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from Rhizobium etli." Plant Mol Biol **29**(3): 453-64.
- Cardenas, 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.
- Cardenas, L., T. L. Holdaway-Clarke, et al. (2000). "Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors." Plant Physiol **123**(2): 443-52.
- Cardenas, L. and C. Quinto (2008). "Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors." Plant Signal Behav **3**(12): 1101-2.
- Cardenas, L., J. E. Thomas-Oates, et al. (2003). "The role of nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in Phaseolus vulgaris." Mol Plant Microbe Interact **16**(4): 326-34.
- Carol, R. J. and L. Dolan (2002). "Building a hair: tip growth in Arabidopsis thaliana root hairs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **357**(1422): 815-21.
- Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut (1993). "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth." Plant J **3**(1): 1-30.
- Cassab, G. I. (1998). "Plant Cell Wall Proteins." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**: 281-309.
- Certal, A. C., R. B. Almeida, et al. (2008). "Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in Nicotiana tabacum pollen tubes." Plant Cell **20**(3): 614-34.
- Combiér JP, K. H. J. E., Hohjec N, Gamas P and Niebel A. (2008). "Evidence for the involvement in Nodulation of the Two small Putative Regulatory Peptide-Encoding gene MtRALF and MtDVL1." MPMI **21**(8): 1118-1127.
- Cooper, J. E. (2007). "Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue." J Appl Microbiol **103**(5): 1355-65.

- Cosgrove, D. J. (1999). "Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **50**: 391-417.
- Cosgrove, D. J. (2000). "Loosening of plant cell walls by expansins." Nature **407**(6802): 321-6.
- Cosgrove, D. J. (2005). "Growth of the plant cell wall." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 850-61.
- Cosgrove, D. J., L. C. Li, et al. (2002). "The growing world of expansins." Plant Cell Physiol **43**(12): 1436-44.
- Covey, P. A., C. C. Subbaiah, et al. "A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation." Plant Physiol **153**(2): 703-15.
- Crdenas, 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.
- D'Haeze, W. and M. Holsters (2002). "Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development." Glycobiology **12**(6): 79R-105R.
- Dambly, S. and M. Boutry (2001). "The two major plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases display different regulatory properties." J Biol Chem **276**(10): 7017-22.
- Downie, J. A. and S. A. Walker (1999). "Plant responses to nodulation factors." Curr Opin Plant Biol **2**(6): 483-9.
- Duby, G. and M. Boutry (2009). "The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles." Pflugers Arch **457**(3): 645-55.
- Duby, G., W. Poreba, et al. (2009). "Activation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by 14-3-3 proteins is negatively controlled by two phosphorylation sites within the H<sup>+</sup>-ATPase C-terminal region." J Biol Chem **284**(7): 4213-21.
- Fahraeus, G. (1957). "The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique." J Gen Microbiol **16**(2): 374-81.
- Fasano, J. M., S. J. Swanson, et al. (2001). "Changes in root cap pH are required for the gravity response of the Arabidopsis root." Plant Cell **13**(4): 907-21.
- Felle, H. H., Éva Kondorosi, Adám Kondorosi, Michael Schultze (1996). "Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals." The Plant Journal **10**(2): 295-301.
- Felle, H. H., E. Kondorosi, et al. (2000). "How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors." Plant Physiol **124**(3): 1373-80.
- Foreman, J., V. Demidchik, et al. (2003). "Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth." Nature **422**(6930): 442-6.
- Gaxiola, R. A., M. G. Palmgren, et al. (2007). "Plant proton pumps." FEBS Lett **581**(12): 2204-14.
- Gilroy, S. and D. L. Jones (2000). "Through form to function: root hair development and nutrient uptake." Trends Plant Sci **5**(2): 56-60.
- Hager, A. (2003). "Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects." J Plant Res **116**(6): 483-505.
- Haruta, M. and C. P. Constabel (2003). "Rapid alkalization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells." Plant Physiol **131**(2): 814-23.
- Haruta, M., G. Monshausen, et al. (2008). "A cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in Arabidopsis seedlings: identification of AtRALF1 peptide." Biochemistry **47**(24): 6311-21.
- Hohl, M. G., Heribert and Schopfer, Peter (1995). "The cryptic-growth response of maize coleoptiles and its relationship to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent cell wall stiffening." PHYSIOLOGIA PLANTARUM **94**: 491-498.

- Hose, E., D. T. Clarkson, et al. (2001). "The exodermis: a variable apoplastic barrier." J Exp Bot **52**(365): 2245-64.
- Humphrey, T. V., D. T. Bonetta, et al. (2007). "Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors." New Phytol **176**(1): 7-21.
- Kinoshita, T., M. Nishimura, et al. (1995). "Cytosolic Concentration of Ca<sup>2+</sup> Regulates the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase in Guard Cells of Fava Bean." Plant Cell **7**(8): 1333-1342.
- Knight, M. R. (2007). "New ideas on root hair growth appear from the flanks." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20649-50.
- Lino, B., V. M. Baizabal-Aguirre, et al. (1998). "The plasma-membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation." Planta **204**(3): 352-9.
- Liszak, A., B. Kenk, et al. (2003). "Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth." Planta **217**(4): 658-67.
- Majewska-Sawka, A. and E. A. Nothnagel (2000). "The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development." Plant Physiol **122**(1): 3-10.
- Martin, C., K. Bhatt, et al. (2001). "Shaping in plant cells." Curr Opin Plant Biol **4**(6): 540-9.
- Messerli, M. A., G. Danuser, et al. (1999). "Pulsatile influxes of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> lag growth pulses of *Lilium longiflorum* pollen tubes." J Cell Sci **112** ( Pt 10): 1497-509.
- Monshausen, G. B., T. N. Bibikova, et al. (2007). "Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20996-1001.
- Monshausen, G. B., T. N. Bibikova, et al. (2009). "Ca<sup>2+</sup> regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots." Plant Cell **21**(8): 2341-56.
- 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.
- Morsomme, P. and M. Boutry (2000). "The plant plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase: structure, function and regulation." Biochim Biophys Acta **1465**(1-2): 1-16.
- Moustacas, A. M., J. Nari, et al. (1991). "Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension." Biochem J **279** ( Pt 2): 351-4.
- Moustacas, A. M., J. Nari, et al. (1986). "Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 2. The role of pectin methyl esterase in the modulation of electrostatic effects in soybean cell walls." Eur J Biochem **155**(1): 191-7.
- Nicol, F. and H. Hofte (1998). "Plant cell expansion: scaling the wall." Curr Opin Plant Biol **1**(1): 12-7.
- Oldroyd, G. E. and J. A. Downie (2008). "Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes." Annu Rev Plant Biol **59**: 519-46.
- Pearce, G., D. S. Moura, et al. (2001). "RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12843-7.
- Pearce, G., Y. Yamaguchi, et al. "Structure-activity studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, reveal an essential--YISY--motif." Peptides **31**(11): 1973-7.
- Pedersen, B. P., M. J. Buch-Pedersen, et al. (2007). "Crystal structure of the plasma membrane proton pump." Nature **450**(7172): 1111-4.
- Pennell, R. (1998). "Cell walls: structures and signals." Curr Opin Plant Biol **1**(6): 504-10.
- Rayle, D. L. and R. E. Cleland (1992). "The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well." Plant Physiol **99**(4): 1271-4.

- Samuels, A. L., M. Fernando, et al. (1992). "Immunofluorescent Localization of Plasma Membrane H-ATPase in Barley Roots and Effects of K Nutrition." Plant Physiol **99**(4): 1509-1514.
- Sherrier, D. J. and K. VandenBosch (1994). "Secretion of cell wall polysaccharides in Vicia root hairs." The Plant Journal **5**(2): 185-195.
- Sieberer, B. J., M. Chabaud, et al. (2009). "A nuclear-targeted cameleon demonstrates intranuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in Medicago truncatula root hairs in response to rhizobial nodulation factors." Plant Physiol **151**(3): 1197-206.
- Taiz L, Z. E., Ed. (2006). Plant physiology, Universitat Jaume I.
- Tuteja, N. and S. Mahajan (2007). "Calcium signaling network in plants: an overview." Plant Signal Behav **2**(2): 79-85.
- Vissenberg, K., S. C. Fry, et al. (2001). "Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in Arabidopsis roots." Plant Physiol **127**(3): 1125-35.