



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

(Departamento de Biología Molecular de Plantas)

**Modificación del metabolismo de trehalosa en nódulos de frijol
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en B. Aarón Barraza Celis

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Federico Esteban Sánchez Rodríguez
Instituto de Biotecnología

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

Dr. Enrique Merino Perez, Instituto de Biotecnología
Dra. Susana Castro Obregón, Instituto de Biotecnología



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.

La realización y conclusión de este proyecto de doctorado fue posible con el apoyo de la beca 169219 otorgada a mi persona por el consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT), además de contar con el apoyo de los proyectos de CONACyT No. 83324 y No. 177744.

Dedicada a ...

A Lilia Leticia Celis Sánchez, mi madre, mi amiga, mi confidente y el faro de luz de mi formación como ser e individuo. Gracias por todo tu apoyo incondicional, por tu guía entre las ciénagas y los barrancos de la incertidumbre y la ignorancia, por mostrarme la luz y seguir por el camino de la rectitud y los principios de ética y moral para así llegar a los valles del conocimiento y así poder crecer en todos los aspectos.

En la memoria de Juan Bautista Celis Aragón, mi abuelo y padre a la vez, que aprendió a enseñarme los principios de honor, de palabra, de caballerosidad, de buenas costumbres, de valorar el adquirir y atesorar el conocimiento, y de creer en mi a pesar de mis errores.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mi tutor el Dr. Federico Esteban Sánchez Rodríguez por su apoyo, paciencia, comprensión, por los regaños, por las discusiones enriquecedoras sobre el proyecto, por sus consejos, por compartirme su experiencia a través de su constante enseñanza, por creer y apostar en mi sin conocerme a fondo, y agradezco por haber encontrado a un tutor con el don de gente y que siempre está dispuesto a escuchar y ver el lado humano tanto del estudiante como del proyecto en realización.

Muchas gracias por ser mi tutor y ahora ser un nuevo referente en mi crecimiento personal.

Agradezco profundamente a María Andrea Murillo Gallo, por ser mi pareja sentimental y unir su vida a la mía, ya que sin tu apoyo, amor y comprensión no habría sido posible mi crecimiento espiritual e integral.

También agradezco a Carmen Quinto, Enrique Merino, Susana Castro, Miguel Lara, Rosario Vera, Enrique Salas, José Luis Reyes, Christian Sohlenkamp, Georgina Estrada Navarrete, Ramiro Lascano, German Robert, Julieta Perez Gimenez, Juan Elías Olivares, Xochitl Alvarado, Olivia Santana, Noreide Nava, Rosana Sánchez, Luis Cárdenas, David Jauregui, Raúl Dávila, Agustín López-Munguía, María Elena Rodríguez, María Luisa Tabche, José Alberto Hernández Eligio, Guadalupe Zavala, Ana Isabel Bieler, Paul Gaytan, Eugenio López, Jorge Yañez por la asesoría académica, técnica y el apoyo incondicional otorgado en todo momento durante el desarrollo de este proyecto doctoral.

Resumen

Las interacciones leguminosa-rhizobia han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas. Durante esta interacción simbiótica se ha detectado la presencia de la trehalosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido) en los nódulos de las leguminosas. Hasta ahora la función de la trehalosa en los nódulos de las leguminosas ha sido escasamente estudiada. En este proyecto, con el uso de la secuencia del genoma de frijol se determinó la presencia de los genes del metabolismo de trehalosa (trehalosa-6-fosfato sintasas, trehalosa-6-fosfato fosfatasas y trehalasa), con las bases de datos de secuencias expresadas etiquetadas (transcriptómica) se determinó sólo la expresión de la trehalasa (*PvTRE1*) y de un integrante de las TPSs clase II (*PvTPS6c2*) en los nódulos de frijol, la expresión de ambos genes es mayoritaria en los nódulos. Con el uso de ARN interferente en nódulos para *PvTRE1* (*PvTRE1-RNAi*) y *PvTPS6c2* (*PvTPS6c2-RNAi*) se redujo significativamente la acumulación de transcrito en ambos casos, para dar lugar al incremento y reducción del contenido de trehalosa en nódulos, respectivamente. Además, se sobre-expresó en nódulos la TPS heteróloga de *Rhizobium etli* (CaMV35S::*ReTPS* o pCAMRT2), para dar lugar al incremento del contenido de trehalosa en nódulos mediante el incremento en la producción de su metabolito intermediario trehalosa-6-fosfato (T6P). La modificación en la acumulación de transcrito y del contenido de trehalosa dio lugar a alteraciones significativas en la expresión de genes del metabolismo de carbono, crecimiento y desarrollo, autofagia, y asimilación de nitrógeno de manera diferencial y específica. El incremento de trehalosa en *PvTRE1-RNAi* afectó positivamente en la viabilidad de los bacteroides y en la fijación de nitrógeno, en cambio el incremento de trehalosa en pCAMRT2 afectó negativamente en la viabilidad de los bacteroides y en la fijación de nitrógeno. Estas modificaciones en los nódulos tuvieron efectos a nivel sistémico, por el hecho de que en las hojas, no modificadas genéticamente, se determinó el incremento del contenido de trehalosa (*PvTRE1-RNAi*) y del contenido relativo de agua, la reducción en el área foliar y la reducción en el contenido de trehalosa (*PvTPS6c2-RNAi*), y el incremento en el área foliar y el contenido relativo de agua (pCAMRT2). Lo que finalmente, conlleva a considerar a la modificación del metabolismo de trehalosa como un nuevo y prometedor mecanismo de mejoramiento de especies cultivables.

Abstract

Legume-rhizobia interactions have been widely studied and characterized. During this symbiotic interaction the disaccharide trehalose (α -D-glucopyranosyl-1,1- α -D-glucopyranoside) has been shown commonly detected in legume nodules. Up to now, the role for trehalose in legume nodules has been poorly understood. In this work, with the use for common bean genome sequence we could determine the presence for trehalose metabolism genes (trehalose-6-phosphate synthases, trehalose-6-phosphate phosphatases, and a single trehalase) in this, with the use of expressed sequence tags or transcriptomic databases we could determine in the legume nodule the expression for trehalase (*PvTRE1*) and just one member (*PvTPS6c2*) for the class II TPS family, and the expression is restricted to nodules in both *PvTRE1* and *PvTPS6c2*. With the use of interference RNA (RNAi) for *PvTRE1* (*PvTRE1*-RNAi) and for *PvTPS6c2* (*PvTPS6c2*-RNAi) we could achieve a significative reduction for transcript accumulation in both *PvTRE1* and *PvTPS6c2*, and to give rise to the increase and the decrease for trehalose content in nodules, respectively. In addition, we overexpressed the heterologous TPS from *Rhizobium etli* in nodules (CaMV35S::*ReTPS* or pCAMRT2) to give rise to the increase for trehalose content by the increase for the trehalose intermediary metabolite trehalose-6-phosphate (T6P). The transcript accumulation modification and the trehalose content modification led to significative changes in gene expression for genes of carbon metabolism, growth and development, autophagy, and nitrogen assimilation in a specific and differential way. The increase for the trehalose content at *PvTRE1*-RNAi nodules the bacteroid viability and the nitrogen fixation was affected positively, in return the increase for the trehalose content in pCAMRT2 nodules the bacteroid viability and the nitrogen fixation was affected negatively. These genetic modifications at nodules had systemic level effects by the fact that in leaves, no genetically modified, we could determine the increase for the trehalose (*PvTRE1*-RNAi) content and the relative water content increase, the decrease in leaf (*PvTPS6c2*-RNAi) area and for the decrease in trehalose content, and the increase in leaf (pCAMRT2) area and the relative water content. Finally, to consider the trehalose metabolism modification as a new and promising mechanism for agricultural crop species improvement.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Introducción	1
Las leguminosas y la fijación de nitrógeno	1
Organogénesis del nódulo	2
Estructura de los nódulos indeterminados y determinados	5
Compuestos aislados durante la simbiosis	7
Trehalosa	8
Impacto de la trehalosa a nivel celular	11
Metabolismo de trehalosa en plantas	11
Trehalosa en la simbiosis	16
Estructura de las enzimas del metabolismo de trehalosa y clasificación de las mismas .	17
Antecedentes	20
Hipótesis	23
Objetivos	23
Objetivo General	23
Objetivos Particulares	23
Metodología	24
Condiciones de crecimiento del material vegetal	24
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	24
Identificación de los genes del metabolismo de trehalosa en frijol	25
Modelamiento de la estructura tridimensional de PvTPS6c2 (dominio TPS y dominio TPP) y de PvTRE1	25

Construcciones generadas para la generación de plantas compuestas de frijol	25
Determinación de la expresión de <i>PvTPS6c2</i> y <i>PvTRE1</i> en raíces noduladas de frijol ...	27
Microscopía confocal	27
Microscopía electrónica de transmisión	27
Determinación de las unidades formadoras de colonia de <i>Rhizobium</i> re-aislados de nódulos	28
Análisis del perfil de carbohidratos solubles con cromatografía líquida de alto desempeño	28
Determinación de la fijación biológica de nitrógeno	28
Análisis de la acumulación de transcritos por qRT-PCR	29
Resultados	30
1. Expresión de genes del metabolismo de trehalosa en leguminosas	30
2. Genes del metabolismo de trehalosa en frijol	32
3. <i>PvTRE1</i> (<i>PvTRE1</i> -RNAi)	33
3.1 Expresión de genes del metabolismo de trehalosa en frijol durante la interacción con <i>Rhizobium</i>	33
3.2 Estructura génica, tridimensional y distribución de <i>PvTRE1</i>	35
3.3 Análisis de la expresión de <i>PvTRE1</i> durante el desarrollo de los nódulos	39
3.4 Silenciamiento de <i>PvTRE1</i> y efectos sobre la expresión de genes del metabolismo de carbono, crecimiento y desarrollo, y autofagia	43
3.5 Análisis de la estructura y ultra-estructura de los nódulos transgénicos de <i>PvTRE1</i> -RNAi	46
3.6 Análisis del contenido de carbohidratos en nódulos transgénicos de <i>PvTRE1</i> -RNAi	48

3.7 Análisis de parámetros fisiológicos de los nódulos transgénicos de <i>PvTRE1</i> -RNAi	49
3.8 Análisis de parámetros fisiológicos de las hojas de las plantas compuestas con nódulos transgénicos de <i>PvTRE1</i> -RNAi	54
4. <i>PvTPS6c2</i> (<i>PvTPS6c2</i> -RNAi)	58
4.1 Estructura génica, tridimensional y distribución de <i>PvTPS6c2</i> (dominio sintasa y dominio fosfatasa)	61
4.2 Análisis de la expresión de <i>PvTPS6c2</i> durante el desarrollo de los nódulos .	65
4.3 Silenciamiento de <i>PvTPS6c2</i> y efectos sobre la expresión de genes del metabolismo de carbono, crecimiento y desarrollo, y autofagia	67
4.4 Análisis de la ultra-estructura de los nódulos transgénicos de <i>PvTPS6c2</i> -RNAi	68
4.5 Análisis del contenido de carbohidratos de nódulos transgénicos de <i>PvTPS6c2</i> -RNAi	69
4.6 Análisis de parámetros fisiológicos de los nódulos transgénicos de <i>PvTPS6c2</i> -RNAi	70
4.7 Análisis de parámetros fisiológicos de las hojas de las plantas compuestas con nódulos transgénicos de <i>PvTPS6c2</i> -RNAi	74
5. pCAMRT2 (Sobre-expresión heteróloga de la <i>TPS</i> de <i>R. etli</i>)	78
5.1 Análisis de la zona central de los nódulos transgénicos de pCAMRT2, producción de trehalosa y viabilidad de los bacteroides	79
5.2 Efectos sobre la expresión de genes del metabolismo carbono, crecimiento y desarrollo, autofagia y asimilación de nitrógeno en nódulos de pCAMRT2	82
5.3 Análisis del contenido de carbohidratos solubles, fijación de nitrógeno y biomasa de los nódulos transgénicos de pCAMRT2	84
5.4 Análisis de parámetros fisiológicos de las hojas de las plantas compuestas con nódulos transgénicos de pCAMRT2	86
Discusión	90

<i>PvTRE1</i> -RNAi	90
<i>PvTPS6c2</i> -RNAi	92
pCAMRT2	94
Conclusión	96
Perspectivas	97
Bibliografía	98
Información Suplementaria	110
S1. Construcciones realizadas	110
S1.1 Análisis de expresión	110
S1.2 Silenciamiento génico	110
S1.3 Sobre-expresión	111
S2. Cepas de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 generadas	112
S2.1 Análisis de expresión	112
S2.2 Silenciamiento génico	113
S2.3 Sobre-expresión	113
S2.4 Controles	113
S3. TPSs	114
S3.1 TPSs clase I	114
S3.2 TPSs clase II	115
S4. TPPs	116
S5. TREs	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	2
Figura 2	4
Figura 3	6
Figura 4	7
Figura 5	8
Figura 6	10
Figura 7	18
Figura 8	19
Figura 9	35
Figura 10	36
Figura 11	37
Figura 12	38
Figura 13	39
Figura 14	40
Figura 15	41
Figura 16	41
Figura 17	42
Figura 18	43
Figura 19	44
Figura 20	45
Figura 21	46

Figura 22	47
Figura 23	48
Figura 24	48
Figura 25	49
Figura 26	50
Figura 27	51
Figura 28	52
Figura 29	52
Figura 30	53
Figura 31	54
Figura 32	55
Figura 33	56
Figura 34	57
Figura 35	57
Figura 36	58
Figura 37	60
Figura 38	61
Figura 39	62
Figura 40	63
Figura 41	64
Figura 42	65
Figura 43	66

Figura 44	66
Figura 45	67
Figura 46	68
Figura 47	69
Figura 48	70
Figura 49	71
Figura 50	72
Figura 51	73
Figura 52	73
Figura 53	74
Figura 54	75
Figura 55	76
Figura 56	77
Figura 57	78
Figura 58	79
Figura 59	80
Figura 60	81
Figura 61	81
Figura 62	82
Figura 63	83
Figura 64	84
Figura 65	85

Figura 66	86
Figura 67	86
Figura 68	87
Figura 69	88
Figura 70	88
Figura 71	89
Figura S1	110
Figura S2	111
Figura S3	112
Figura S4	118
Figura S5	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	4
Tabla 2	31
Tabla 3	32
Tabla 4	32
Tabla 5	33
Tabla 6	59
Tabla S1	112
Tabla S2	113
Tabla S3	114
Tabla S4	115
Tabla S5	115
Tabla S6	116
Tabla S7	116
Tabla S8	117
Tabla S9	121
Tabla S10	121

ARTÍCULO PUBLICADO

Artículo Publicado en: New Phytologist

Autores: Aarón Barraza, Georgina Estrada-Navarrete, Maria Elena Rodriguez-Alegria, Agustin Lopez-Munguia, Enrique Merino, Carmen Quinto, Federico Sánchez.

Título: Down-regulation of *PvTRE1* enhances nodule biomass and bacteroid number in the common bean

Año: 2013

Volumen: 197

Número: 1

Páginas: 194-206

DOI: 10.1111/nph.12002

Documento anexo después de Información Suplementaria.

MODIFICACIÓN DEL METABOLISMO DE TREHALOSA EN NÓDULOS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es sin duda el nutriente más importante y requerido por las plantas, siendo un componente esencial de todos los aminoácidos y ácidos nucleicos. Sin embargo, la disponibilidad del nitrógeno es limitado en muchos suelos, y aunque la atmósfera de la tierra está constituida por un 78.1% de nitrógeno gaseoso o atmosférico (N₂), las plantas no son capaces de utilizar esta forma de nitrógeno. Para compensarlo, la agricultura moderna ha dependido enormemente de fertilizantes nitrogenados industriales para obtener la máxima productividad de cultivos. Sin embargo, se requieren de grandes cantidades de combustibles fósiles para la producción y distribución de fertilizantes nitrogenados. Además, la aplicación de fertilizantes químicos es un proceso demasiado ineficiente ya que alrededor del 30-50% de los fertilizantes nitrogenados aplicados se pierde por lixiviación, resultando en problemas ambientales significativos, como la eutrofización de los cuerpos de agua (Ferguson *et al.*, 2010). En la naturaleza existe un grupo de plantas que a través de la evolución han desarrollado la capacidad de relacionarse con un grupo de bacterias que en una relación mutualista tienen la capacidad de fijar el nitrógeno y proporcionárselo a la planta, la cual a su vez le proporciona fuentes de carbono a la bacteria, relación conocida como simbiosis.

LAS LEGUMINOSAS Y LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

La familia de las plantas capaz de realizar este tipo de relación son las leguminosas o *Leguminosae*, las cuales han evolucionado una relación simbiótica con bacterias del suelo que tienen la capacidad de fijar el N₂ atmosférico, denominadas en conjunto como rizobia (bacterias de los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*). Una vez que la simbiosis se ha establecido, los rizobia fijan nitrógeno atmosférico y este es provisto a la leguminosa hospedera. Debido a que el nitrógeno es un factor clave limitante para el crecimiento y desarrollo de la planta, la habilidad de las leguminosas para establecer la simbiosis con rizobia fijadoras de nitrógeno les ayuda a tener una ventaja distintiva sobre otras especies vegetales.

Las leguminosas representan el tercer grupo más grande de la clase Angiosperma y son el segundo grupo de plantas cultivadas utilizadas para la alimentación a nivel mundial. De hecho, son cultivados sobre el 12-15% de la tierra disponible cultivable y son responsables de más del 25% de la producción primaria de cultivos. Entre las leguminosas de consumo humano directo, el 43% de la producción total de leguminosas le corresponde al frijol (*Phaseolus vulgaris*, Figura 1), estimada en el 2008 en 27,213,841 toneladas en todo el mundo (FAOSTAT, 2010).

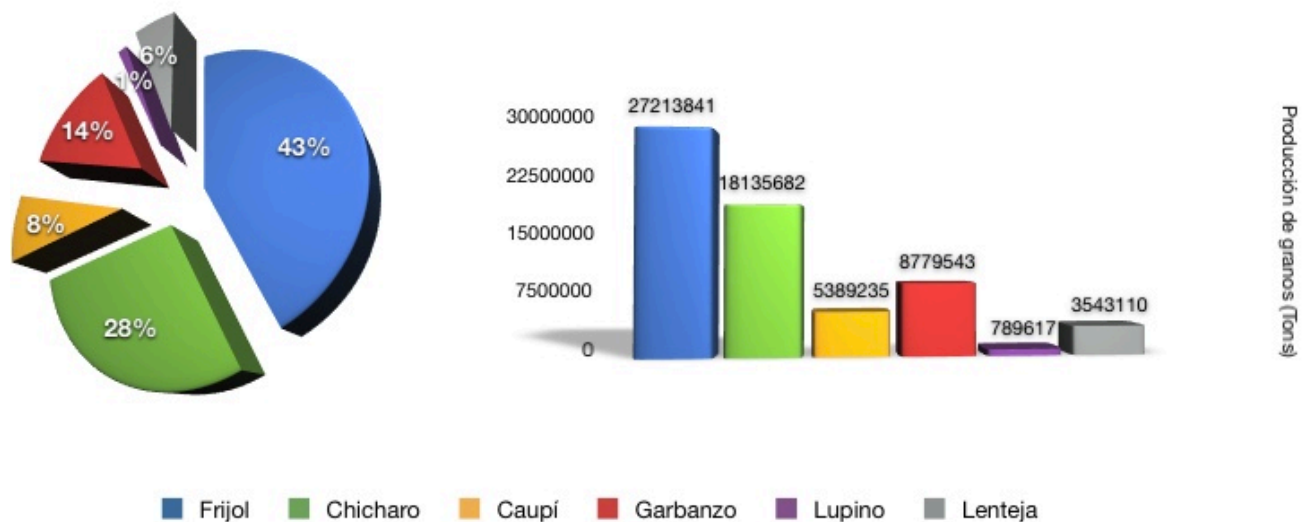


Figura 1. Producción mundial de leguminosas para 2008. (FAOSTAT, 2010).

Los rhizobias invaden las raíces de las plantas leguminosas compatibles, dirigiendo el desarrollo de estructuras especializadas de la raíz llamadas nódulos. En el nódulo, las bacterias se diferencian en bacterioides y catalizan la reducción de N_2 atmosférico a amonio con el uso del complejo enzimático de la nitrogenasa, un proceso denominado “fijación simbiótica de nitrógeno”. La simbiosis leguminosa-rhizobia es la asociación simbiótica más importante en términos de fijación biológica de nitrógeno, produciendo 200 millones de toneladas crudas de nitrógeno anualmente. Esta capacidad de producción de nitrógeno es aprovechada durante la rotación de cultivos, al rotar leguminosas como alfalfa y trébol, plantas que al ser removidas del suelo mejoran el contenido orgánico y el volumen del suelo que va a ser utilizado para el siguiente cultivo (Gage, 2004).

ORGANOGENESIS DEL NÓDULO

La formación del nódulo se inicia cuando las raíces de las plantas hospederas exudan compuestos flavonoides fenólicos hacia la rizósfera (Figura 2). Los exudados parcialmente determinan la especificidad de la relación simbiótica debido a que cada una de las especies de rhizobia responden a flavonoides específicos. La mayoría de las especies de rhizobia interactúan con sólo algunas leguminosas, pero algunas han mostrado poseer un amplio rango de hospederos.

Los flavonoides exudados atraen a las bacterias hacia las raíces, y se considera que estos flavonoides activan la expresión de los genes *nod* (nodulación) de los rhizobias, dando lugar a la producción y secreción de lipo-quitina-oligo-sacáridos cepa específico, también conocidos como factores de nodulación (NF) (Figura 2). Los NFs poseen un esqueleto de oligosacáridos de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina con un grupo acil-graso enlazado al azúcar no reductor. El factor determinante para la especificidad simbiote-hospedero se atribuye a los diferentes sustituyentes de los NFs unidos al esqueleto de oligosacárido. La presencia de especies compatibles de rhizobia y sus NFs correspondientes por lo general son suficientes para desencadenar el desarrollo del nódulo. La punta de las raíces emergentes es el blanco primario para la infección de los rhizobias, probablemente debido a

que estas poseen paredes celulares más delgadas y menos entrecruzadas y permiten el rearrreglo de los microtúbulos subyacentes, cambiando el tráfico vesicular hacia la punta de la raíz en crecimiento y así permitiendo una mejor penetración subsecuente por los rhizobia. La adhesión de los rhizobia a los pelos radiculares estimula la deformación del pelo radicular en un periodo de 6-8 horas y también promueve las divisiones celulares del tejido cortical (Figura 2, Tabla 1) (Calvert *et al.*, 1984; Mathews *et al.*, 1989; Ferguson *et al.*, 2010; Popp & Ott, 2011).

Los rhizobia tienen dos maneras de ingresar a la raíz de la planta: por medio del pelo radicular o a través de grietas en la epidermis de la raíz. La infección de los pelos radiculares es la vía más común e involucra la formación de los hilos de infección, las cuales son estructuras tubulares compuestas de componentes de la pared celular vegetal que actúan como un paso para las bacterias hacia las células corticales de la planta. Los rhizobia ingresan a través de la punta deformada de la raíz, la cual encapsula una pequeña parte de las bacterias en división (Figura 2, Tabla 1). Las bacterias envueltas poseen una concentración de NFs enriquecida así como también enzimas para degradar la pared celular. La penetración de la pared celular, pero no de su membrana plasmática, es seguida por la re-síntesis y re-digestión de la misma. Este ciclo redundante acoplado con la inclusión de las bacterias en la matriz extracelular viscosa y el crecimiento constante de las bacterias da lugar a una presión “hacia adelante” que es necesaria para presionar en contra de la presión de turgencia del pelo radicular. La dinámica de este proceso resulta en la formación de una pared celular derivada para el hilo de infección lleno de bacterias en proliferación embebidas en la matriz extracelular (Gage, 2004; Oldroyd & Downie, 2004; Ding & Oldroyd, 2009; Popp & Ott, 2011).

Es posible que los rhizobia invasores estimulen el incremento constante en los niveles de NF lo que promueve la activación mitótica de las células corticales de la raíz. Esto eventualmente resulta en el desarrollo del primordio del nódulo (Figura 2, Tabla 1). La posición radial de las divisiones celulares, y las del primordio, son controladas por el gradiente posicional de hormonas tales como el etileno (Heidstra *et al.*, 1997; Lohar *et al.*, 2009). Por consiguiente, la mayoría de los nódulos se desarrollan cerca de las células radiales del xilema, apartados del floema. El hilo de infección crece a través del pelo radicular hacia el cortex de la raíz y las células son nuevamente inducidas a dividirse. Las bacterias son liberadas cerca de la punta en crecimiento del hilo de infección hacia una gota de infección dentro del citoplasma de la célula hospedera. A través de un proceso semejante a la endocitosis, las bacterias son rodeadas por una membrana derivada de la célula hospedera, denominada membrana peribacteroidal, la cual en conjunto se le conoce como el simbiosoma (Ding & Oldroyd, 2009; Oldroyd *et al.*, 2009; Popp & Ott, 2011).

Las bacterias envueltas en la membrana continúan dividiéndose dentro de las células hospederas antes de diferenciarse en bacteroides e iniciar la fijación de nitrógeno. El N₂ atmosférico es convertido en amonio por los bacteroides y subsecuentemente es asimilado por la planta mediante su conversión en glutamina mediado por la glutamina sintetasa. La glutamina es posteriormente convertida a glutamato por la glutamato sintasa. La conversión rápida de amonio genera un gradiente el cual se cree que promueve su exportación desde los bacteroides (Udvardi & Day, 1997). Los tejidos vasculares, así como los tejidos centrales conformados de células invadidas y no invadidas, son mantenidas en el cortex (Figura 2, Tabla 1). Entre el interior del nódulo y las células vecinas, la planta y los bacteroides intercambian nutrientes esenciales (Calvert *et al.*, 1984). El transporte pasivo impulsado por el

potencial de membrana a través de la membrana peribacteroidal facilita la captación de nutrientes hacia los simbiosomas (Udvardi & Day, 1997). Estos mecanismos permiten la asimilación de fotosintatos hacia el nódulo para los bacteroides (como ácidos dicarboxílicos, malato), y la exportación de varios compuestos, incluyendo el nitrógeno fijado a la raíz (por ejemplo, glutamina) (Silvente *et al.*, 2002; Oldroyd *et al.*, 2009; Ferguson *et al.*, 2010; Kouchi *et al.*, 2010; Popp & Ott, 2011).

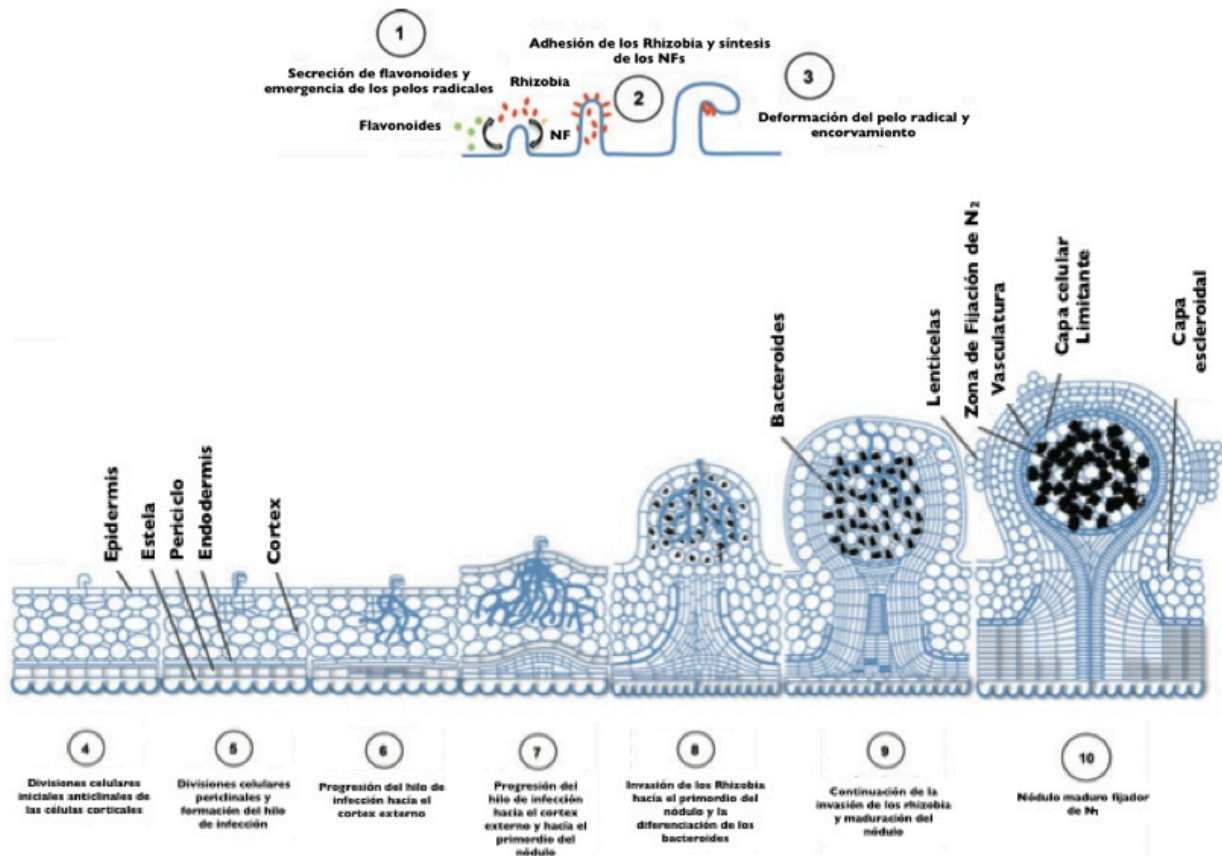


Figura 2. Interacción Leguminosa-Rhizobia. Desde la secreción de flavonoides y síntesis de NFs (1), hasta la fijación simbiótica de nitrógeno (10). Tomado y modificado de Ferguson *et al.*, 2010.

Tabla 1. Listado de genes involucrados directamente con el inicio del hilo de infección, avance del hilo de infección hacia la epidermis y cortex, liberación de los rhizobia en las células infectadas y establecimiento del simbiosoma (Popp & Ott, 2011).

Etapa	Tipos de Nódulos	
	Nódulos Indeterminados	Nódulos Determinados
Inicio del hilo de infección	<i>RabA2</i>	<i>NUP85</i>
	<i>NSP1</i>	<i>NUP133</i>
	<i>NSP2</i>	<i>NENA</i>
	<i>IPD3</i>	<i>NSP1</i>
	<i>RPG</i>	<i>NSP2</i>
	<i>NIN</i>	<i>CYCLOPS</i>
	<i>DMI1</i>	<i>POLLUX</i>

Etapa	Tipos de Nódulos	
	Nódulos Indeterminados	Nódulos Determinados
	<i>DMI2</i>	<i>CASTOR</i>
	<i>DMI3</i>	<i>CCAMK</i>
	<i>HCL/LYK3</i>	<i>SYMRK</i>
	<i>NFP</i>	<i>NFR1</i>
		<i>NFR5</i>
Avance del hilo de infección hacia la epidermis	<i>LYK3</i>	<i>CRINKLE</i>
	<i>LYK4</i>	<i>ITD1, 2, 3, 4</i>
	<i>NFP</i>	<i>NAP1</i>
	<i>CRE1</i>	<i>CERBERUS</i>
	<i>FLOT</i>	<i>NIN</i>
	<i>SYMREM1</i>	<i>HIT1</i>
	<i>RIT1</i>	<i>NSRING</i>
	<i>LIN</i>	<i>CIP73</i>
	<i>BIT1</i>	
	<i>POODLE</i>	
	<i>ERN1</i>	
	<i>VPY</i>	
Avance del hilo de infección en el cortex	<i>HMGR</i>	
	<i>API</i>	
Liberación de los rhizobia	<i>LIN</i>	<i>ALB1</i>
	<i>LATD</i>	
	<i>SYMREM1</i>	
	<i>DMI2</i>	
Establecimiento del simbiosoma	<i>DNF1</i>	<i>IGN1</i>
		<i>FEN1</i>

ESTRUCTURA DE LOS NODULOS INDETERMINADOS Y DETERMINADOS

En leguminosas existen dos tipos de morfología de nódulos: determinados e indeterminados. El tipo de nódulo que se forme depende de la planta hospedera. Las diferencias entre estos dos tipos de nódulos son el origen de las divisiones celulares internas, mantenimiento de una región meristemática, y la forma de los nódulos maduros. Los nódulos indeterminados, presentan en sus primeras divisiones celulares de forma anticlinal en el cortex interno, seguido por divisiones periclinales en la endodermis y el periciclo. En conjunto, estas divisiones promueven la formación del primordio del nódulo. Estos poseen un meristemo más persistente, lo que resulta en nódulos de forma cilíndrica, como se ejemplifica con los nódulos de alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium repens*), chícharo (*Pisum sativum*) y *Medicago truncatula* (Figura 3). El meristemo apical genera continuamente nuevas células que son infectadas por bacterias. En su madurez, los nódulos indeterminados tienen una población heterogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno, debido a la división celular constante, dando lugar a

un gradiente de estadios de desarrollo mientras el nódulo se elonga (Figura 3). Estos nódulos también poseen un sistema vascular distinto, menos ramificado en comparación con el que presentan los nódulos determinados (Gage, 2004; Ferguson *et al.*, 2010; Kouchi *et al.*, 2010; Popp & Ott, 2011).

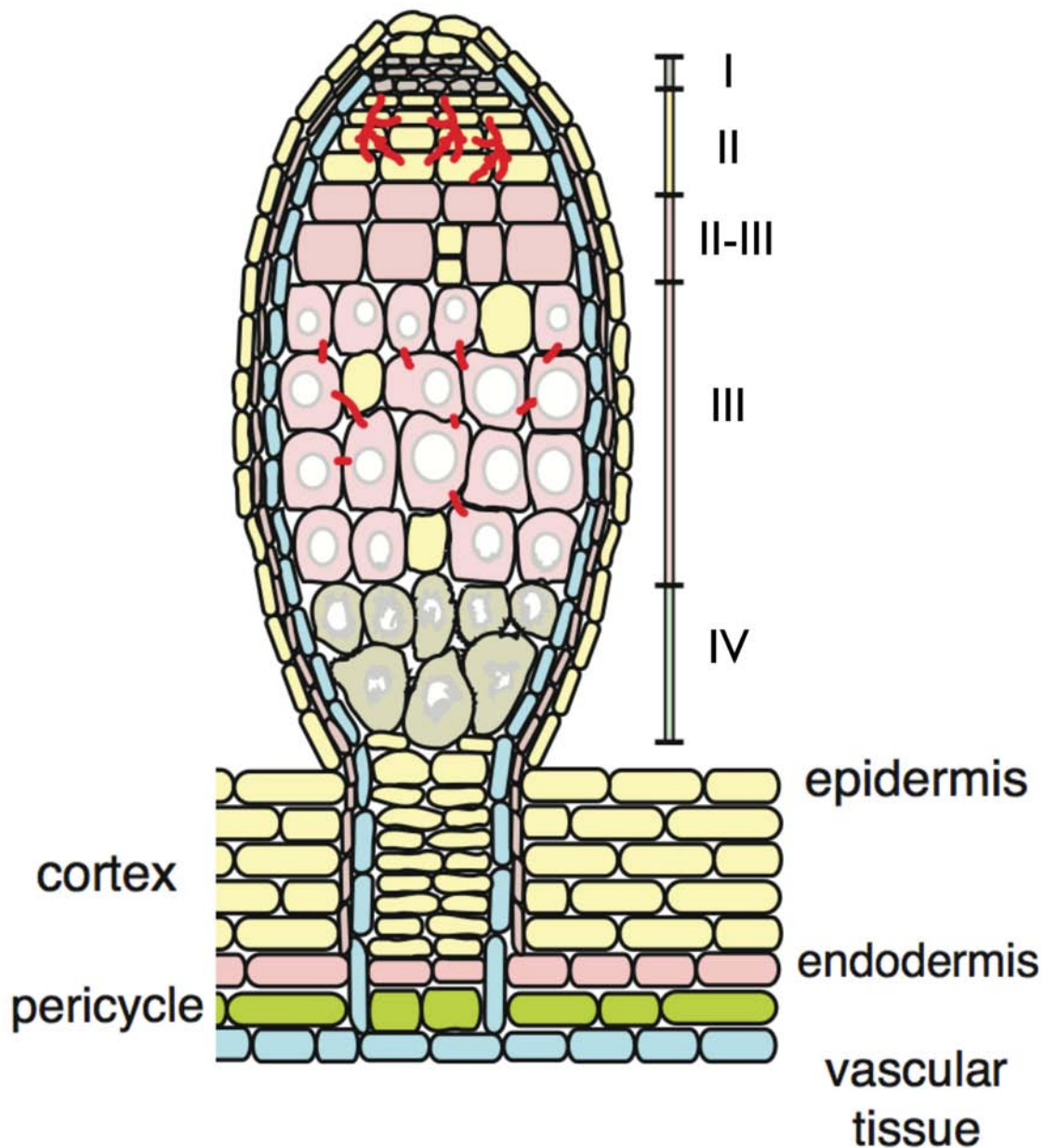


Figura 3. Estructura de los nódulos indeterminados. I: meristemo. II: zona de infección. II-III: interzona. III: zona de fijación de nitrógeno. IV: zona de senescencia. Tomado y modificado de Popp & Ott., 2011.

En contraste, los nódulos determinados son usualmente esféricos, carecen de un meristemo persistente y no presentan un gradiente de desarrollo claro. Las primeras divisiones celulares de un nódulo determinado típico ocurren en el cortex exterior (Figura 4). Los nódulos maduros poseen una población homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno, por el hecho de que la diferenciación de las células infectadas ocurre de manera simultánea, seguida por la senescencia de las mismas. Estos nódulos tienen

una vida media de unas pocas semanas. Cuando los nódulos viejos senescen, nuevos nódulos son formados en porciones recién desarrolladas de la raíz. Además, los nódulos determinados forman lenticelas, las cuales son estructuras que permiten el intercambio gaseoso. Las leguminosas que forman nódulos determinados son predominantemente especies tropicales y subtropicales, incluyendo a la soya (*Glycine max*), la pongamia (*Pongamia pinnata*) y el frijol (*Phaseolus vulgaris*), y también incluyen a otras especies de climas templados como *Lotus japonicus* (Gage, 2004; Ferguson *et al.*, 2010; Kouchi *et al.*, 2010; Popp & Ott, 2011).

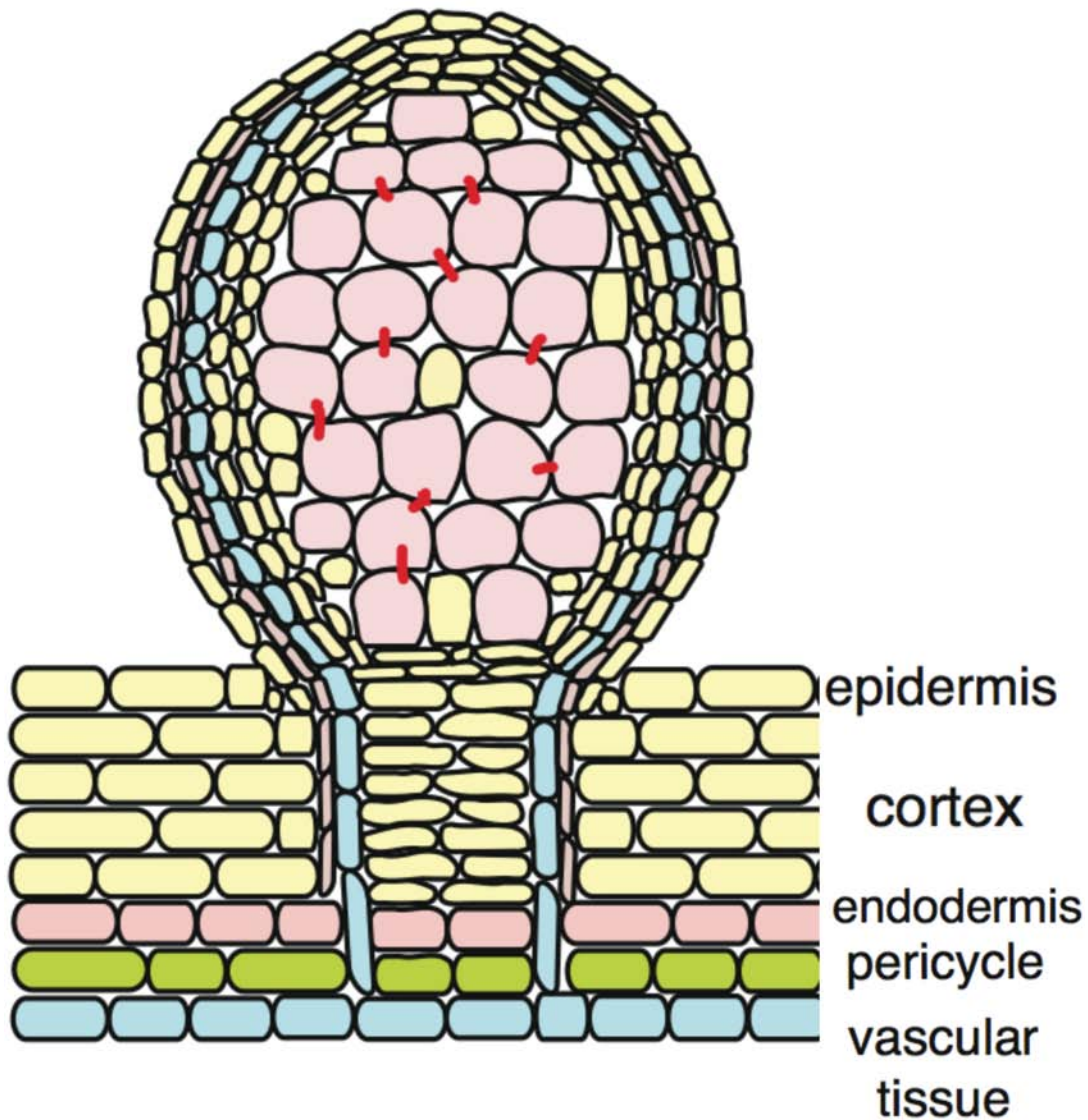


Figura 4. Estructura de los nódulos determinados. Tomado y modificado de Popp & Ott., 2011.

COMPUESTOS AISLADOS DURANTE LA SIMBIOSIS

Como se mencionó anteriormente la identificación y aislamiento de los genes y de las proteínas codificadas por los mismos, ha sido el enfoque principal en la caracterización de la interacción

simbiótica leguminosa-rhizobia. Sin embargo, también se ha establecido el enfoque de aislar, caracterizar, y cuantificar a los compuestos, o productos de las proteínas, involucrados durante la interacción simbiótica. Los compuestos caracterizados se clasifican en ácidos orgánicos: ácido acético, ácido trans-aconítico, ácido adípico, ácido β -ceto-adípico, ácido anísico, ácido antranílico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido caprílico, ácido trans-cinámico, ácido citramálico, ácido cítrico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido fumárico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido glutárico, ácido isocítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido mendélico, ácido metil-malónico, ácido trans-trans-mucónico, ácido oxálico, ácido protocatechuico, ácido piro-glutámico (2-pirrolidona-5-carboxílico), ácido quínico, ácido succínico, ácido siríngico, ácido tartárico, ácido úrico, ácido urocánico, ácido vanílico; aminoácidos: aspartato, glutamato, arginina, serina, γ -aminobutirato, glutamina, alanina, prolina, valina, histidina, tirosina, β -alanina, fenilalanina, asparagina, lisina, glicina, metionina, isoleucina, α -aminoadipato; y carbohidratos: sacarosa, mio-inositol, D-chiro-inositol, D-pinitol, glucosa, ononitol, maltosa y trehalosa. Estos compuestos son importantes para el desarrollo, están involucrados en la tolerancia al estrés abiótico y biótico, y señalización (Streeter, 1987; Fougère *et al.*, 1991; Salminen & Streeter, 1992; López *et al.*, 2008).

TREHALOSA

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor con enlace glicosídico α,α -1,1 (Figura 5); ampliamente distribuido en la naturaleza, presente en bacterias, arqueobacterias, hongos, animales (excepto vertebrados) y plantas; se encuentra entre los compuestos mencionados involucrados en desarrollo y señalización en plantas (Elbein *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2008).

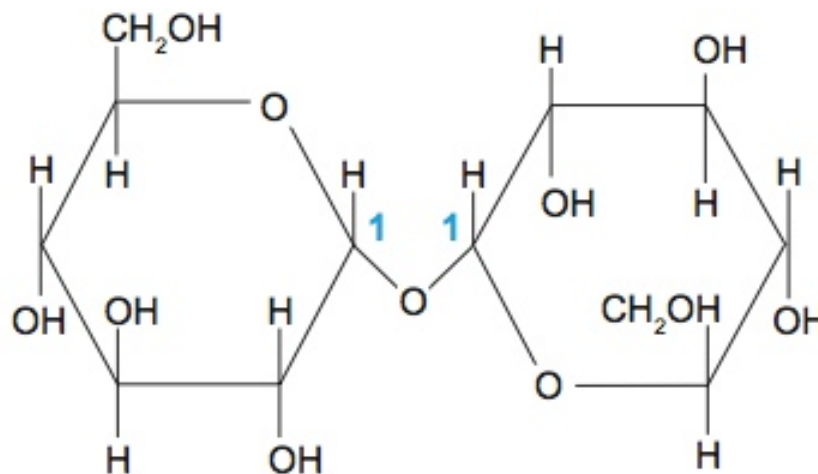


Figura 5. Molécula de α,α -trehalosa o trehalosa. Ambas glucosas están unidas en sus carbonos 1 o reductores.

En la actualidad, se han reportado cinco rutas de síntesis de trehalosa y sólo una vía de degradación (Figura 6a); siendo la vía de la trehalosa-6-fosfato sintasa/trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPS/TPP) la de mayor distribución en la naturaleza (Figura 6b), dado que está presente en los tres dominios taxonómicos (bacteria, archaea y eukarya; sólo los animales vertebrados carecen de esta vía de síntesis

de trehalosa) (Avonce *et al.*, 2006). Esta vía de síntesis consta de dos etapas: (i) UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato son los sustratos de la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) para generar trehalosa-6-fosfato (T6P) y UDP, y (ii) T6P es el sustrato de la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) generando trehalosa y fosfato (Cabib & LeLoir, 1958).

La vía de la trehalosa sintasa (TS) está distribuida sólo en las bacterias (Figura 6b) y consta de una etapa de síntesis (Figura 6a): la maltosa es el sustrato de la trehalosa sintasa (TS), la cual isomeriza los enlaces α,α -1,4 de la maltosa a los enlaces α,α -1,1 de la trehalosa (Elbein *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2006).

La vía de la maltooligosil trehalosa sintasa/maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (TREY/TREZ) está distribuida sólo en las bacterias y consiste en la síntesis de trehalosa a partir de maltodextrinas, tales como glucógeno o almidón, conformada por dos etapas (Figura 6a): (i) la maltooligosil trehalosa sintasa (TREY) lleva a cabo la transglucosilación de la última glucosa en la maltodextrina a partir de un enlace α,α -1,4 a un enlace α,α -1,1 para generar maltooligosil trehalosa; y (ii) la maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (TREZ) por medio de hidrólisis libera a la trehalosa (Streeter & Bhagwat, 1999; Higashiyama, 2002).

La vía de la trehalosa fosforilasa (TREP) hidróliza la trehalosa en presencia de fosfato inorgánico para producir glucosa-1-fosfato y glucosa (Figura 6a), y está distribuida entre las archaea, bacterias y hongos (Figura 6b). Esta reacción sólo se ha efectuado *in vitro*, por lo cual, no se tiene la certeza de la participación activa de esta vía en la síntesis o degradación de trehalosa *in vivo* (Schiraldi *et al.*, 2002).

La vía de la trehalosa glucosiltransferasa sintasa (TRET), se distribuye en las archaea (Figura 6b), sintetiza trehalosa de manera reversible a partir de ADP-Glucosa y glucosa (Figura 6a); también puede usar como precursores las moléculas de UDP-glucosa y GDP-glucosa, pero con una menor eficiencia con respecto al uso de ADP-glucosa. La TRET transfiere la glucosa de la ADP-glucosa en la posición 1 de la glucosa libre, para generar trehalosa (Qu *et al.*, 2004; Ryu *et al.*, 2005).

La degradación de la trehalosa es mediada por la enzima trehalasa (TRE), y esta vía de degradación de trehalosa está distribuida en las bacterias, hongos, animales y plantas (Figura 6b), a partir de trehalosa y mediante la hidrólisis del enlace α,α -1,1 de este disacárido produce dos moléculas de glucosa (Figura 6a) (Avonce *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2008).

La distribución de las vías de biosíntesis de trehalosa es amplia, considerándose casi ubicua, ya que los vertebrados son los únicos que carecen de vías de producción de trehalosa, pero si presentan la ruta de degradación de la misma (Figura 6b). Acorde a Avonce *et al.*, (2006) el grupo taxonómico de las bacterias (y al dominio bacteria) posee la mayoría de las vías de síntesis de trehalosa (Figura 6b). Las archaea (reino y dominio) sólo carecen de la vía TS (Figura 6b). En el dominio eukarya se han encontrado las vías TREP y TPS/TPP, siendo el reino fungí el que las posee; en cambio los metazoa y plantae sólo presentan la vía TPS/TPP (Figura 6b). De las vías de síntesis reportadas, la vía TPS/TPP es la que se encuentra en los tres dominios taxonómicos, y en los cinco reinos taxonómicos (Figura 6b).

La vía TPS/TPP, ha sido ampliamente caracterizada y el impacto de la misma a nivel sistémico se ha demostrado, al regular la glucólisis, fotosíntesis, desarrollo y diferenciación. Ya que esta vía de síntesis influye negativamente en la hexocinasa para regular el flujo de glucosa que es metabolizada y no agotar el ATP presente en la célula que es requerido para fosforilar a la glucosa; influye positivamente en la fijación de carbono al regular positivamente el flujo del carbono de los órganos fuente a los sumidero; así como regular la negativamente a “Sucrose non-fermenting Related protein Kinase 1” (SnRK1), que es clave para regular a los procesos anteriores y de manera indirecta sobre “Target of Rapamycin” (TOR) (Thevelein & Hohmann, 1995; Paul & Pellny, 2003; Schluempmann *et al.*, 2003; Pellny *et al.*, 2004; Schluempmann *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010).

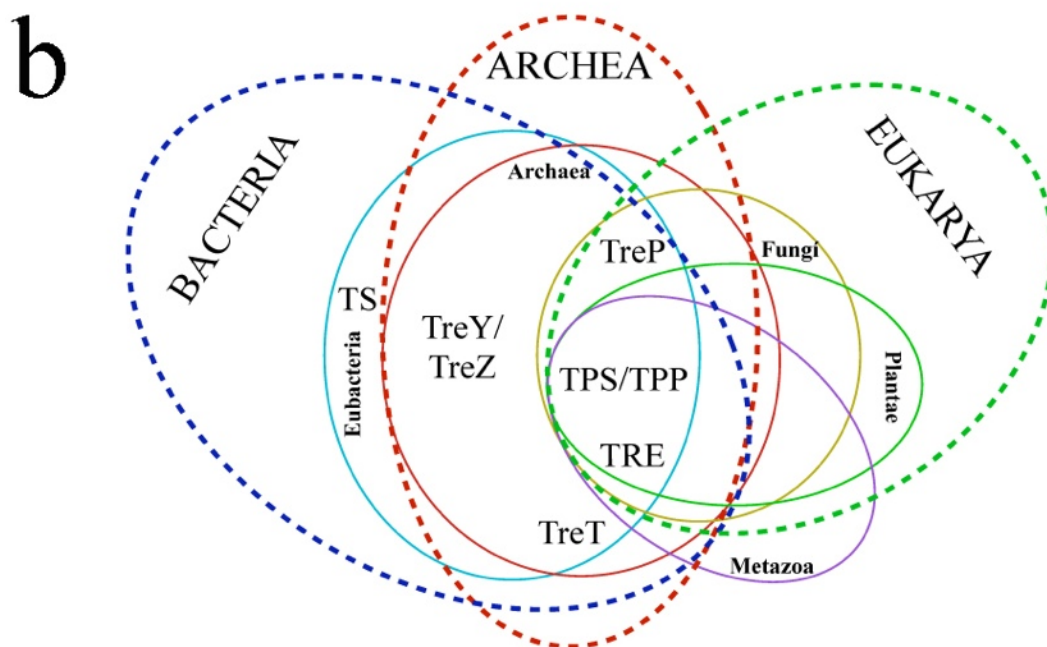
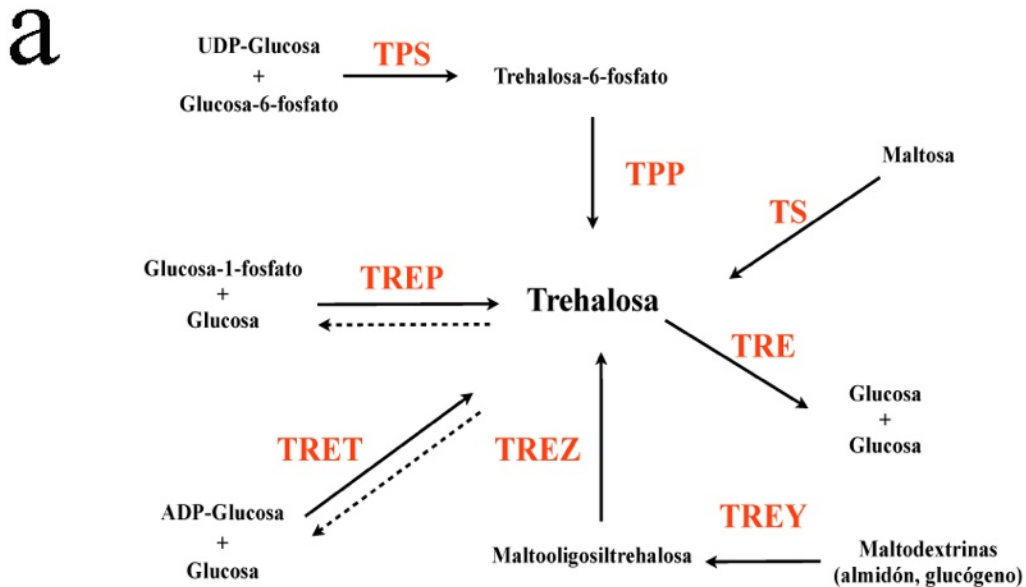


Figura 6. Vías de síntesis y distribución de las rutas de biosíntesis de trehalosa en diferentes grupos de organismos. a) Vías de síntesis, las enzimas involucradas en letras rojas y los sustratos/productos en letras negras. b) Distribución de las vías de síntesis, los dominios se muestran con líneas punteadas (bacteria, archaea y eukarya); los reinos se muestran con líneas continuas (eubacteria, archaea, fungi, metazoa y plantae). TPS: trehalosa-6-fosfato sintasa, TPP: trehalosa-6-fosfato fosfatasa, TS: trehalosa sintasa, TREY: maltooligosil trehalosa sintasa, TREZ: maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa, TRET: trehalosa glucosiltransferasa sintasa, TREP: trehalosa fosforilasa, TRE: trehalasa.

IMPACTO DE LA TREHALOSA A NIVEL CELULAR

Mediante ensayos *in vitro* se ha demostrado que la trehalosa estabiliza la estructura tridimensional de las proteínas, así como de las membranas, durante el estrés térmico, oxidativo, y por congelamiento (Singer & Lindquist, 1998a; Singer & Lindquist, 1998b; Benaroudj *et al.*, 2001; Elbein *et al.*, 2003).

Al adicionar trehalosa a plantas de *Arabidopsis* se ha determinado la inducción de una respuesta defensiva al modificar el patrón de expresión en genes involucrados en la síntesis de pared celular, proteínas de respuesta a patógenos, así como de genes del metabolismo de carbono y nitrógeno (Bae *et al.*, 2005). La presencia de hongos patógenos, que sintetizan trehalosa durante la infección, da lugar a la inducción de la trehalasa, al parecer esta enzima que es parte del metabolismo de trehalosa (degradación), podría ser integrante de la gran batería de proteínas de respuesta a patógenos (Brodmann *et al.*, 2002). También se ha demostrado que la adición de trehalosa al medio de cultivo de células animales promueve el proceso de autofagia sólo en las células que poseen priones, poli-Q, α -sinucleína o abundancia de proteínas mal plegadas, e incluso células cancerosas, para dar lugar a la degradación de éstas y así eliminar los efectos nocivos provocados por la presencia de las mismas (Sarkar *et al.*, 2007; Aguib *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Casarejos *et al.*, 2011).

La modificación en la expresión de TPS en plantas, y como consecuencia alteración en la síntesis de T6P y trehalosa tiene efectos directos en la regulación del desarrollo embrionario, vegetativo, floración, morfología celular, distribución del carbono fijado, tolerancia al estrés abiótico, y en los parámetros fotosintéticos (Holmstrom *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997; Eastmond *et al.*, 2002; Schluepmann *et al.*, 2003; Avonce *et al.*, 2004; Pellny *et al.*, 2004; Schluepmann *et al.*, 2004; Van Dijken *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2010). Además, la sobre-expresión de TPP se mejora la tolerancia al estrés abiótico, así como regulación de genes involucrados en la respuesta para la tolerancia al estrés abiótico; y regulación positiva sobre TPS, lo que sugiere un sistema de retroalimentación positiva en la vía de síntesis TPS/TPP, y a su vez ser regulada por la trehalasa para modular los niveles de trehalosa en la célula vegetal (Müller *et al.*, 2001a; Frison *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2008).

METABOLISMO DE TREHALOSA EN PLANTAS

Los primeros reportes de la presencia y determinación de trehalosa en plantas se limitaron únicamente a plantas de resurrección, tales como *Selaginella lepidophylla* y *Myrothamnus flabellifolia*; aunado al hecho de la dificultad para determinar y cuantificar a la trehalosa en las plantas que no son de resurrección, esto condujo a la suposición de que la función de este disacárido era de poca o escasa relevancia en las plantas, y probablemente las funciones de este disacárido se le atribuían a la sacarosa.

Sin embargo, esto cambio al modificar el metabolismo de la trehalosa en plantas, por medio de ingeniería genética, introduciendo los genes de síntesis de trehalosa en las mismas (*EcOtsA*, *EcOtsB*), dieron lugar a la generación de fenotipos relacionados con alteraciones significativas en la señalización celular endógena (Goddijn *et al.*, 1997).

En *Arabidopsis* se aislaron y caracterizaron genes codificantes para TPS y TPP; sin embargo, después de la publicación del genoma completo de *Arabidopsis*, no sólo se confirmó la presencia de genes de síntesis de trehalosa de la vía TPS/TPP, sino que estos son muy abundantes en el genoma formando familias génicas, para los genes codificantes de TPS y TPP (Blázquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998; Leyman *et al.*, 2001). Después se pudo detectar y cuantificar trehalosa; así como determinar la importancia de la misma por las alteraciones en el desarrollo embrionario, foliar, división celular, pared celular, arquitectura de las inflorescencias, biomasa de las plántulas y plantas adultas, fotosíntesis, utilización de sacarosa, metabolismo de almidón, y tolerancia al estrés abiótico (sequía), lo que sugiere la participación importante del metabolismo de trehalosa en plantas (Eastmond *et al.*, 2002; Garg *et al.*, 2002; Schluepmann *et al.*, 2003; Pellny *et al.*, 2004; Kolbe *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006; Satoh-Nagasawa *et al.*, 2006; Karim *et al.*, 2007; Ramon *et al.*, 2007).

En *Arabidopsis* hay en total 21 genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de trehalosa, contrastando con 8 genes que codifican para enzimas involucradas en las síntesis de sacarosa (Langenkämper *et al.*, 2002; Lunn, 2007). Es de llamar la atención que hay 23 genes que codifican para la sacarosa sintasa, la invertasa alcalina, y la invertasa ácida, enzimas involucradas en la degradación de sacarosa; contrastando con la presencia de un sólo gen que codifica para la trehalasa (Avonce *et al.*, 2006).

Análisis filogenéticos de los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de trehalosa en plantas, y la misma trehalosa, han demostrado que estos tienen un origen muy temprano en la evolución de las plantas. Así como la proliferación de TPS y TPP en plantas, formando familias génicas en ambos casos. En plantas se han determinado genes para dos clases de TPS, probablemente genes para dos clases de TPP (por el hecho de que la subdivisión de éstas no es tan evidente como la observada en los genes que codifican para TPS clase I y II), y un sólo gen que codifica para una clase de trehalasa. Al parecer todas las familias génicas de los genes que codifican para enzimas del metabolismo de trehalosa, en plantas tienen orígenes muy tempranos, incluso previos a la divergencia entre las familias Streptophyta y Chlorophyta. En plantas los genes que codifican para TPS están relacionados estrechamente con los genes de hongos que codifican para TPS, y otros genes eucariotas que codifican para TPS, lo que sugiere un origen eucariota de los genes que codifican para TPS en plantas. Mientras que los genes que codifican para TPP en plantas, están más relacionados con los genes que codifican para TPP (*OtsB*) de bacterias, probablemente porque estos podrían haberse originado a partir del ancestro bacteriano endosimbiótico de la mitocondria (Avonce *et al.*, 2006; Lunn, 2007).

Las TPS en plantas están clasificadas en clase I (éstas poseen un dominio sintasa, y un dominio fosfatasa carente de las cajas de actividad), y en clase II (poseen un dominio sintasa, y un dominio fosfatasa con las cajas de actividad); además análisis de los aminoácidos, así como de las secuencias codificantes para estos, de los dominios catalíticos demostró que todas las sustituciones en los codones

que se encontraron eran sinónimas a nivel de aminoácidos (Avonce *et al.*, 2006; Lunn, 2007; Chary *et al.*, 2008). Las genes que codifican para las TPS clase II se expresan en toda la planta, y la importancia de estos radica en el hecho de estar sujetas a un alto grado de regulación, particularmente por la intensidad luminosa, azúcares, inanición, ritmos diurnos, y citocininas; además las TPS clase II están sujetas a fosforilación por SnRK1 y cinasas dependientes de calcio (Harmer *et al.*, 2000; Schluepmann *et al.*, 2004; Brenner *et al.*, 2005; Glinski & Weckwerth, 2005; Harthill *et al.*, 2006).

En plantas los genes que codifican para TPP están muy conservados entre las especies vegetales. Contrastando con las TPS, la función de las TPP es más clara. Todas las TPP de plantas poseen motivos de aminoácidos característicos de la súper-familia de enzimas 2-haloácida deshalogenasa. Una caracterización extensiva de las propiedades bioquímicas de las TPP de plantas (OsTPP1, OsTPP2, en arroz) demostró que éstas poseen una alta especificidad de sustrato (T6P) con valores de K_m de 92 μM y 186 μM para OsTPP1 y OsTPP2, respectivamente. Lo que indica que las TPP de plantas, poseen 10 veces mayor afinidad por su sustrato que las TPP de microorganismos, además de que éstas últimas también pueden hacer uso de glucosa-1-fosfato (G1P) y glucosa-6-fosfato (G6P) como sustratos. En arroz, la expresión de los genes que codifican para las TPPs están regulados por diferentes estreses (congelamiento, sequía, salinidad, adición de ácido abscísico); y en *Arabidopsis* las TPP, además de los anteriores tratamientos, también son inducidos por hipoxia y bajas concentraciones de nitratos. También se ha reportado la presencia de un péptido señal o de tránsito en las TPP, lo que podría sugerir que éstas se podrían localizar en el cloroplasto, aunque algunas de las TPP son citosólicas (Burroughs *et al.*, 2006; Shima *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2008).

Los genes que codifican para trehalasas, en plantas no han proliferado al grado que lo han hecho los genes que codifican para TPS y TPP; ya que en *Arabidopsis* y en *G. max* se ha encontrado sólo un gen que codifica para la trehalasa, en ambos casos. La trehalasa puede ser requerida para metabolizar la trehalosa producida durante la síntesis de T6P, y también la trehalosa encontrada durante las interacciones planta-patógeno. La expresión del gen que codifica para la trehalasa, en *Arabidopsis*, se induce en las raíces e hipocótilos para contender contra la infección provocada por el hongo patógeno *Plasmodiophora brassicae*. La expresión del gen de la trehalasa, en *Arabidopsis*, es abundante en flores y semillas, la cual es una enzima acoplada a la membrana plasmática, orientada hacia la pared celular, con actividad extracelular; al parecer esto implica que la regulación de los niveles intracelulares de trehalosa requieren del transporte de la misma hacia el exterior de la célula (en la región apoplástica) para ser metabolizada por la trehalasa (Brodmann *et al.*, 2002; Frison *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2008). Y en la simbiosis leguminosa-rhizobia, se ha determinado la inducción de la actividad de la trehalasa en los nódulos de las leguminosas (Müller *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1995; Aeschbacher *et al.*, 1999)

En plantas la participación de la vía de síntesis de trehalosa, y muy probablemente la única, es como regulador central del metabolismo. Esta función regulatoria es llevada a cabo principalmente por la T6P, además que las enzimas involucradas en la síntesis de trehalosa podrían tener una función regulatoria de la misma. Al expresar el gen que codifica para TPS de *Escherichia coli* en mutantes *Attps1* se pudo restablecer o rescatar el fenotipo silvestre. Al expresar los genes que codifican para TPS o TPP de *E. coli* en *Arabidopsis* influye directamente en la cantidad de T6P registrada en cada caso; lo que repercute en la capacidad de crecer en presencia de sacarosa. Los niveles altos de T6P estimulan el crecimiento en medio de cultivo adicionado con sacarosa, y la disminución o la carencia de T6P

compromete la capacidad de la planta para utilizar los azúcares presentes en el medio de cultivo. Las cantidades de T6P presentes en las plantas, están relacionadas inversamente con las cantidades de hexosas fosfato y UDP-glucosa (UDPG), lo que sugiere que de alguna manera la T6P podría regular la cantidad de estos metabolitos o intermediarios del metabolismo de carbono. T6P no sólo está involucrada en la regulación de la utilización de la sacarosa, pero las cantidades de T6P también responden a la sacarosa; ya que se ha determinado un incremento en los niveles de T6P de 27 veces dentro de un rango de tiempo de 3 horas después de suplementar con sacarosa. En plantas la T6P es producida a partir de G6P y UDPG, productos de la degradación de sacarosa. UDPG se produce directamente por medio de la sacarosa sintasa; la G6P se produce a partir de la glucosa ya sea por medio de la actividad de la invertasa o la hexocinasa, o a partir de la fructosa o fructosa-6-fosfato (F6P) por medio de la actividad de la sacarosa sintasa, fructocinasa, y la fosfoglucosa isomerasa. La F6P estimula la síntesis de trehalosa en levadura, y por lo tanto la síntesis de trehalosa podría ser un buen indicador de los niveles de este metabolito. En plantas los niveles de T6P podrían regular directamente los niveles de los reservorios de hexosas fosfato y UDPG (Schluepmann *et al.*, 2003; Pellny *et al.*, 2004; Kolbe *et al.*, 2005; Lunn *et al.*, 2006; Lunn, 2007). UDPG y G6P son moléculas centrales a partir de las cuales todas las funciones celulares son derivadas, energía a partir de la respiración y esqueletos de carbono para la síntesis de celulosa, pared celular, almidón, lípidos, proteínas, y sacarosa. La UDPG en plantas es muy relevante por el hecho de ser el precursor principal para la síntesis de pared celular.

La UDPG y G6P son los precursores de la trehalosa, y por ende la trehalosa tiene una participación central en el metabolismo y del desarrollo vegetal. Por lo tanto, la síntesis de T6P y trehalosa puede actuar potencialmente como indicador efectivo del nivel del reservorio de G6P y UDPG sin comprometer otras funciones. La importancia de este reservorio para determinar el crecimiento fue confirmado en *Arabidopsis*, ya que se encontró relación directa entre los niveles del reservorio de hexosas fosfato (G1P, G6P, F6P) y la biomasa; también se determinó que la relación entre biomasa y los niveles de trehalosa fue positiva. Al alterar la vía de síntesis de trehalosa se han determinado alteraciones en diferentes tejidos, esto podría deberse a la participación de la T6P al unir el reservorio de hexosas fosfato con el crecimiento y desarrollo. La expresión constitutiva de TPS podría permitir el incremento de los niveles de T6P bajo condiciones de alto suplemento de asimilados fotosintéticos y un flujo constante hacia el reservorio de hexosas fosfato, pero la cantidad de hexosas fosfato de este reservorio disminuyen al enfrentar condiciones de inanición y estrés, así como una regulación del contenido de T6P mediado a través de las TPP. La T6P podría inducir los mecanismos de regulación homeostática para así regular el contenido del reservorio de hexosas fosfato (Paul *et al.*, 2008).

El metabolismo del almidón es blanco directo de la T6P, ya que la acumulación de almidón está directamente regulada por el metabolismo de trehalosa; ya que se ha demostrado una relación directa entre acumulación de almidón al adicionar trehalosa al medio de cultivo, junto con un aumento en la expresión de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), probablemente corresponde este aumento en la expresión con una regulación transcripcional del gen que codifica para esta enzima llevado a cabo por el metabolismo de trehalosa. La T6P activa a la AGPasa por medio de un mecanismo de activación redox dependiente de tiorredoxina (Kolbe *et al.*, 2005). Este mecanismo de activación tiene lugar en condiciones de concentración alta de sacarosa, lo que a su vez induce el incremento de los niveles de T6P. El metabolismo de trehalosa no sólo influye en la síntesis de almidón, también regula la degradación del mismo. Esto se debe al hecho de que en presencia de trehalosa los niveles de almidón

aumentan debido a la inhibición en la degradación del mismo; por la inhibición de la transcripción de *SEX1* y la β -amilasa llevado a cabo por el factor de transcripción ABI4 (Wingler *et al.*, 2000; Schluepmann *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2007).

El gen *AtTPS1* (que codifica para TPS) es necesaria para poder continuar con el desarrollo más allá del estadio de torpedo, al final de la embriogénesis temprana. Esto podría deberse a que la relación T6P/trehalosa tiene impacto sobre la coordinación entre metabolismo y desarrollo. El estadio de torpedo se caracteriza por ser la etapa en que se detienen las divisiones celulares, se inicia el proceso de expansión celular y de diferenciación, así como la acumulación de compuestos de almacenamiento. Los embriones mutantes en *Attps1* aun poseen la capacidad de metabolizar sacarosa para producir compuestos de reserva. También se ha determinado acumulación de sacarosa y almidón debido a una disminución en el flujo de metabolitos para la producción de lípidos y proteínas, lo que lleva a una dramática reducción en la división celular, alteraciones en la biosíntesis de la pared celular que dan lugar al engrosamiento de la misma (Eastmond *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2006).

En el desarrollo vegetativo se ha demostrado la importancia de la TPS, ya que en las mutantes de *Attps1*, que lograron pasar del estadio de torpedo por medio de la expresión transitoria de *AtTPS1*, son incapaces de establecer un desarrollo vegetativo normal. Las plantas que expresan los genes que codifican para TPS o TPP de *E. coli* tienen alterado el desarrollo vegetativo, lo que correlaciona con el contenido de T6P. En hojas, tanto como en plántulas, existe la relación entre el contenido de T6P y los niveles del reservorio de hexosas fosfato y UPDG. Es de destacar que la capacidad fotosintética por unidad de área foliar esta incrementada en las plantas que expresan el gen que codifica para TPS de *E. coli*. Este incremento se debe a un aumento específico en la cantidad y actividad de la enzima Rubisco, así como a un incremento en la cantidad de clorofila y del complejo colector de luz (Pellny *et al.*, 2004). Contrastando estos cambios, las plantas expresando el gen que codifica para TPP de *E. coli*, da lugar a una reducción en los niveles de T6P, y como consecuencia la capacidad fotosintética por unidad de área foliar disminuye (Paul & Pellny, 2003). Esto sugiere que alterar el metabolismo de trehalosa podría ser una estrategia para modificar la fotosíntesis en las plantas, y por ende mejorar el rendimiento de las plantas cultivables (Van Dijken *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2010).

Se ha demostrado en *Arabidopsis* que la expresión de *AtTPS1* es necesario para la transición del meristemo apical a la floración (Van Dijken *et al.*, 2004). La expresión ectópica de *AtTPS1* promueve cambios en el desarrollo de la inflorescencia, entre estos cambios se incluye incremento en la ramificación de la inflorescencia. Se determinó la base genética de la mutante de maíz *ramosa3*, esta mutante se caracteriza por tener un aumento de las ramificaciones de las inflorescencias, lo que altera la morfología de la mazorca; se determino que el gen afectado en la mutante *ramosa3* es un gen codificante para TPP, el cual es parte del metabolismo de trehalosa, y regula los niveles de T6P por el hecho de que esta molécula es el sustrato de esta enzima para generar trehalosa. Lo que sugiere que la acumulación de T6P en los meristemas de las inflorescencias de las mutantes de *ramosa3* es el factor detonante de las alteraciones fenotípicas observadas (Satoh-Nagasawa *et al.*, 2006). Por el hecho de que los meristemas se caracterizan por coordinar el abastecimiento constante de intermediarios (UDPG, G6P) con el crecimiento y desarrollo celular, da lugar a la posibilidad de que T6P sea esencial tanto en la floración como en el desarrollo vegetativo y embrionario (Gómez *et al.*, 2006).

La síntesis de T6P y trehalosa pueden ser indicadores efectivos del nivel de los reservorios de G6P y UDPG sin comprometer alguna otra función del metabolismo de trehalosa. T6P es una molécula poco abundante, y los niveles de producción de la misma responden rápidamente al suministro de sacarosa. La síntesis de T6P mediada por *AtTPSI*, y la expresión constitutiva de la misma, refleja la disponibilidad de hexosas fosfato, UDPG, y sacarosa. La participación de estos azúcares como moléculas señaladoras ha sido ampliamente documentado (Moore *et al.*, 2003; Wiese *et al.*, 2004; Rolland *et al.*, 2006; Baena-González & Sheen, 2008; Paul *et al.*, 2008). La glucosa puede señalar a través de la hexocinasa, la cual detecta los niveles de glucosa en la célula, y actúa como molécula señal e integradora de la senescencia (Moore *et al.*, 2003). La sacarosa controla específicamente la traducción de factores transcripcionales tipo bZIP, y por lo tanto la expresión de los genes que son blancos de estos (Wiese *et al.*, 2004; Lunn, 2008). La poca abundancia y la respuesta dinámica de la T6P podría potenciar la comunicación rápida y específica del estado metabólico que refleje los niveles de los reservorios de G6P, UDPG, y sacarosa; y por lo tanto, proveer así una vía de señalización diferente y específica de la que hay para otros azúcares (Moore *et al.*, 2003; Wiese *et al.*, 2004; Lunn *et al.*, 2006; Rolland *et al.*, 2006; Wingler *et al.*, 2012).

Además, es importante hacer la comparación con la fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP), la cual también es una molécula reguladora poco abundante con una respuesta dinámica. La F2,6BP regula la interconversión de F6P y fructosa-1,6-bisfosfato, e influye los niveles de los reservorios de hexosas y triosas fosfato. Contrastando con la modificación de los niveles de T6P, la modificación de los niveles de F2,6BP sólo produce efectos limitados a la partición de sacarosa y almidón. Los efectos de amplio rango determinados sobre el crecimiento y desarrollo ocasionados por la modificación en los niveles de T6P no se observan al alterar los niveles de F2,6BP. La F2,6BP es una molécula importante en la regulación metabólica que no está ligada con el crecimiento y desarrollo como lo está la T6P (Van Schaftingen *et al.*, 1980; Scott *et al.*, 2000; Trevanion, 2002).

TREHALOSA EN LA SIMBIOSIS

En la interacción simbiótica, leguminosa-rhizobia, se ha demostrado la presencia de trehalosa como una constante; desde el reconocimiento del rhizobia por los pelos radiculares de la raíz de la planta leguminosa hasta la fijación activa de nitrógeno en el nódulo (Streeter, 1985; Salminen & Streeter, 1986; Müller *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 2001b; Brechenmacher *et al.*, 2010; Vauclare *et al.*, 2010).

La determinación de la presencia y producción de trehalosa, durante la interacción simbiótica planta-rhizobia, se ha caracterizado extensiva y casi exclusivamente en los rhizobia, esto podría deberse a la disponibilidad de los genomas secuenciados de los mismos; dejando casi de lado a la caracterización de la producción de trehalosa en plantas leguminosas, aunado a la dificultad de detección de este disacárido en plantas mesófilas. Hay tres vías de síntesis de trehalosa caracterizadas en los rhizobia (*B. japonicum*, *Rhizobium etli*, y *Mesorhizobium loti*), las cuales son TPS/TPP, TS, y TREY/TREZ; estas vías de síntesis se activan o reprimen diferencialmente, acorde a la etapa del proceso de establecimiento de la relación simbiótica, así como al estrés ambiental a que esté sometida la leguminosa durante la interacción simbiótica una vez establecida (Farías-Rodríguez *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006; Streeter & Gomez, 2006; Cytryn *et al.*, 2007; McIntyre *et al.*, 2007; Sugawara *et al.*, 2010).

La presencia de trehalosa en leguminosas se ha determinado sólo durante la interacción simbiótica con los rhizobia; existe correlación de la presencia de trehalosa con la tolerancia al estrés hídrico, con la calidad, producción, y germinación del grano de frijol (*P. vulgaris*). Además, en nódulos senescentes el carbohidrato no estructural más abundante es la trehalosa, por encima del almidón y la sacarosa (Farías-Rodríguez *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2001b; Altamirano-Hernández *et al.*, 2007; Vauclare *et al.*, 2010). También, se ha determinado una correlación entre la capacidad de formación de nódulos y síntesis de trehalosa en los rhizobia (Jensen *et al.*, 2005; Ampomah *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2008; Brechenmacher *et al.*, 2010).

La modificación en la acumulación de trehalosa en nódulos de leguminosas se ha realizado empleando tres estrategias: (i) mutar los genes de asimilación de trehalosa, para promover la acumulación de trehalosa en el interior de los rhizobia; (ii) adicionar validamicina A para inhibir la actividad de la trehalasa; y (iii) la sobre-expresión de la TPS del rhizobia para la acumulación de la misma en este. Estas tres estrategias han logrado el aumento en la acumulación de trehalosa en los nódulos de las leguminosas, así como aumento en la fijación de nitrógeno, y la tolerancia al estrés abiótico (deseccación, salinidad) (Tejera Garcia *et al.*, 2005; López *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2008; López *et al.*, 2009; Sugawara *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha reportado variación en la acumulación de transcritos (secuencias expresadas etiquetadas [ESTs]: CV542030, CV535738, CV535700, CV537568) durante la interacción simbiótica planta-rhizobia en condiciones de nodulación en deficiencia de fósforo que corresponde a una TPS clase II y a la trehalasa, respectivamente (dato obtenido en este proyecto), indicando así la presencia de genes del metabolismo de trehalosa durante estas condiciones (Ramírez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007). Al revisar las bases de datos de secuencias expresadas etiquetadas (ESTs) durante la interacción simbiótica, en *G. max*, *L. japonicus*, y *M. truncatula*, se determinó la presencia de transcritos que corresponden a TPSs clase II y trehalasas (Pontius *et al.*, 2003) (datos obtenidos en este proyecto).

Al parecer los reportes de acumulación de transcritos, durante la interacción simbiótica y estrés abiótico, que corresponden a una TPS clase II y a una trehalasa sugiere la participación de estas enzimas en estas condiciones. Es notable no encontrar datos acerca de la acumulación de transcritos correspondientes a TPSs clase I y TPPs, en estas condiciones (Leyman *et al.*, 2001; Chary *et al.*, 2008). La estructura de las enzimas del metabolismo de trehalosa se mencionan a continuación.

ESTRUCTURA DE LAS ENZIMAS DEL METABOLISMO DE TREHALOSA Y CLASIFICACIÓN DE LAS MISMAS

La estructura de las enzimas involucradas en el metabolismo de trehalosa (vía TPS/TPP, y trehalasa) se han determinado en procariotas. A partir de la estructura tridimensional dilucidada de estas enzimas se determinó que los dominios catalíticos de las mismas corresponden prácticamente a la totalidad de la enzima (Gibson *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2007). Por lo tanto, las enzimas TPS (OtsA), TPP (OtsB), y trehalasa son entidades discretas en organismos procariotas (Figura 8a). La denominación de las enzimas de la vía de síntesis trehalosa en procariotas es OtsA/OtsB para TPS y TPP, respectivamente; se debe a mutantes que habían perdido la capacidad de tolerar el estrés osmótico (Osmotic tolerance stress) (Kaasen *et al.*, 1994).

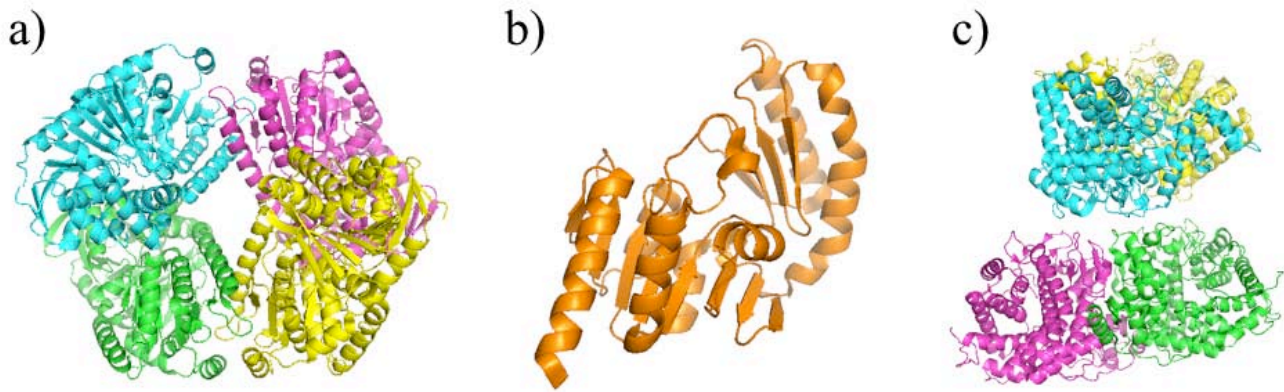


Figura 7. Estructura tridimensional de las enzimas del metabolismo de trehalosa. a) estructura de TPS (OtsA) de *E. coli* formando un homotetrámero b) estructura de TPP (OtsB) de *Thermoplasma acidophilum*, c) estructura de la trehalasa de *E. coli* formando dos homodímeros.

El contar con la estructura tridimensional de las enzimas del metabolismo de trehalosa, y con la secuencia de las mismas; ha sido fundamental para poder inferir la organización estructural de las TPS, TPP y trehalasa eucariotas, ya que sólo se cuenta con las secuencias codificantes de las mismas, y a partir de estas se ha inferido la estructura primaria de las enzimas del metabolismo de trehalosa eucariotas (Leyman *et al.*, 2001; Avonce *et al.*, 2006; Lunn, 2007). La organización estructural de las TPS en eucariotas consta de un dominio sintasa y un dominio fosfatasa. El dominio sintasa presenta el sitio activo donde se lleva a cabo la condensación de la glucosa-6fosfato con la glucosa de la UDPG, el dominio fosfatasa puede contener o no las cajas características de las fosfatasas activas para realizar la desfosforilación de la T6P, presentes en las TPP procariontas con actividad catalítica (LDYD y GDDRSD) (Leyman *et al.*, 2001). Las TPP y trehalasas eucariotas sólo poseen un dominio, el cual corresponde al dominio fosfatasa y trehalasa, respectivamente (Figura 8b). A partir de los datos de la estructura tridimensional de la TPS procarionta (OtsA), se han modelado sólo los dominios sintasa de las TPS de *Magnaporthe grisea* y *Arabidopsis* (AtTPS1 y AtTPS2, TPSs clase I) (Wilson *et al.*, 2007; Vandesteene *et al.*, 2010).

En plantas se han identificado secuencias codificantes de TPS, llegando a formar familias génicas en varios casos (e. g. *Arabidopsis* y *Oryza sativa*). El criterio de clasificación esta basado acorde al porcentaje de identidad y similitud con ScTPS1 (dominio sintasa y dominio fosfatasa sin cajas de actividad) y ScTPS2 (dominio sintasa y dominio fosfatasa con cajas de actividad) de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), para así clasificar a las TPS de plantas en clase I y clase II (Figura 8b) (Leyman *et al.*, 2001; Lunn, 2007; Paul *et al.*, 2008). Las TPS clase I poseen una secuencia regulatoria negativa de la actividad de síntesis de T6P en el extremo amino terminal, carecen de secuencias o motivos de localización subcelular, pero se ha reportado su presencia en vacuola, citosol, cloroplasto y núcleo (así como en las células acompañantes del xilema); poseen un dominio sintasa muy conservado y un dominio sintasa que carece de las cajas de actividad características de las fosfatasas (lo que sugiere que este dominio tiene más una función regulatoria que funcional) (Van Dijck *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2007). En las TPS clase II hay una región de fosforilación dentro de la región amino

terminal, llevada a cabo por SnRK1, para así poder interactuar con las proteínas 14-3-3 (proteínas de andamiaje) y “Multiprotein bridging factor 1c”(MBF1c, coactivador transcripcional en respuesta a estrés por calor); poseen un dominio sintasa conservado y un dominio fosfatasa que presenta las cajas de actividad características, la conservación de ambos dominios, y la complementación funcional de mutantes de levadura en $\Delta tps1$ y $\Delta tps2$, con sólo una secuencia codificante para una TPS clase II de *Arabidopsis*, sugiere que las TPS clase II poseen actividad tanto de sintasa como de fosfatasa (Moorhead *et al.*, 1999; Glinski & Weckwerth, 2005; Harthill *et al.*, 2006; Chary *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011).

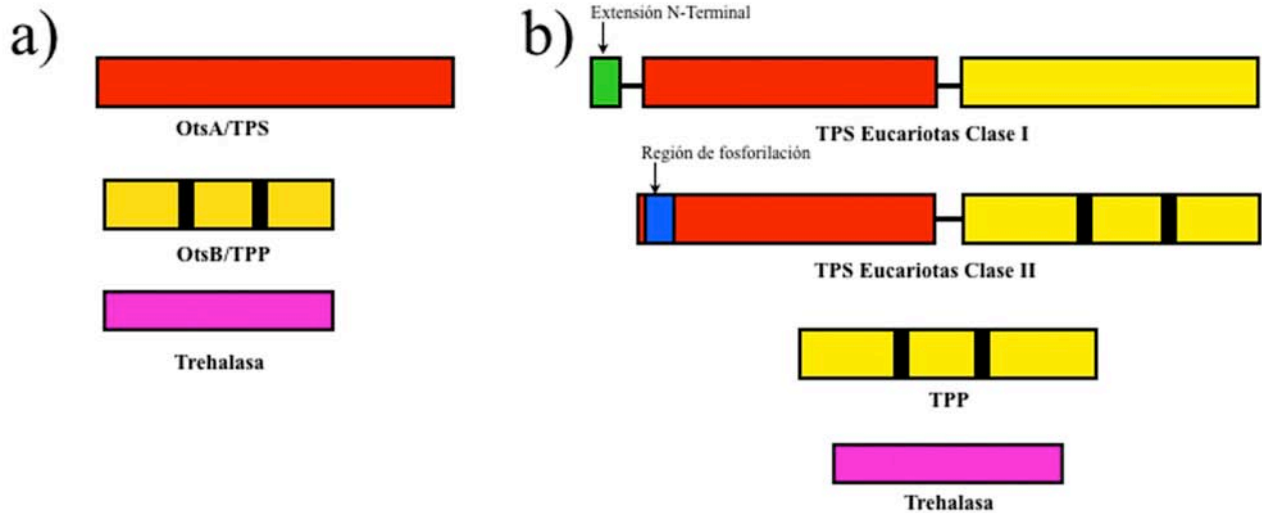


Figura 8. Estructura y clasificación de las enzimas de la vía TPS/TPP. a) Estructura de los integrantes de la vía TPS/TPP (o vía OtsA/OtsB) y de la trehalasa en procariotas, b) Estructura de los integrantes de la vía TPS/TPP y de la trehalasa en eucariotas (plantas).

ANTECEDENTES

La importancia del metabolismo de trehalosa en la interacción leguminosa-rhizobia se observa desde el proceso de colonización de los rhizobia hasta la formación de nódulos maduros. Ya que al analizar los metabolitos presentes durante el inicio de la interacción leguminosa-rhizobia (reconocimiento de los rhizobia por los pelos radiculares) se determinó alteración significativa de 166 metabolitos correspondientes a isoflavonoides, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos carboxílicos, y carbohidratos; de los cuales la trehalosa fue de los metabolitos con mayor inducción (Brechenmacher *et al.*, 2010). Además, mutantes de *B. japonicum* en el metabolismo de trehalosa (vía TPS/TPP y TREY/TREZ) produjeron pocos nódulos maduros en comparación con *B. japonicum* silvestre (Sugawara *et al.*, 2010). En el caso opuesto, mutantes de *S. meliloti* en los transportadores de trehalosa (*thuA*, *thuB*), acumulan más trehalosa y tienen mayor competitividad para formar más nódulos maduros con respecto *S. meliloti* silvestre (Jensen *et al.*, 2005; Ampomah *et al.*, 2008). Al mutar el gen *OtsA* o sobre-expresar el mismo en *R. etli* se afecta negativa y positivamente sobre la producción de nódulos, respectivamente (Suárez *et al.*, 2008).

Al promover la acumulación de trehalosa en los nódulos mediante la adición de validamicina A se mejoró la tolerancia al estrés por desecación y salinidad en la leguminosa tratada. Debido al hecho de que la validamicina A es inhibidor enzimático de la trehalasa, la enzima encargada de la degradación de trehalosa (López *et al.*, 2009). Sin embargo, la cuestión de quien de los integrantes de la interacción simbiótica era responsable de la producción de trehalosa no fue clara; hasta que reportes recientes han sugerido que la producción de trehalosa ocurre en ambos actores de la relación simbiótica leguminosa-rhizobia (Vauclare *et al.*, 2010). También estos reportes sugieren que la producción de trehalosa en las etapas iniciales de la interacción hasta el establecimiento del nódulo le corresponde a los rhizobia, y desde el establecimiento del nódulo hasta la senescencia del mismo le corresponde a la leguminosa, e incluso se sugiere el transporte de la trehalosa desde los nódulos hasta las semillas (Altamirano-Hernández *et al.*, 2007; Brechenmacher *et al.*, 2010; Sugawara *et al.*, 2010; Vauclare *et al.*, 2010). Reforzado por el hecho de que en los nódulos senescentes el carbohidrato no estructural más abundante es la trehalosa; también se determinó que la trehalosa presente en los nódulos estaba localizada tanto en el citosol de las células infectadas como dentro de los simbiosomas; pero la leguminosa al hacer uso de sus reservas de carbono endógenas, debido a la inducción de autofagia en las mismas, consumió toda la trehalosa del citosol de las células infectadas sin metabolizar la trehalosa presente en los simbiosomas (o en los bacteroides), lo que sugiere una separación entre la trehalosa producida por la leguminosa y la producida por el bacteroide, ya que la trehalosa de este último no es metabolizada por la leguminosa (Streeter, 1985; Streeter, 1987; Aeschbacher *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2001b; Vauclare *et al.*, 2010).

Por lo anterior, acorde a la disponibilidad de la trehalosa del citosol de las células infectadas y al hecho de que este carbohidrato en los simbiosomas no esté disponible para la leguminosa sugiere que la inducción de la producción de trehalosa y el desarrollo del nódulo están relacionados al hecho, de que el nódulo es un órgano sumidero o consumidor de carbohidratos en el cual los rhizobia en simbiosis llevan a cabo la fijación biológica de N₂. El nódulo al ser un órgano consumidor de carbohidratos recibe de manera constante sacarosa, transportada a través del floema a los órganos en desarrollo o a los órganos consumidores de carbohidratos, la cual es metabolizada principalmente por la sacarosa sintasa en el nódulo. La sacarosa sintasa esta presente durante la fijación biológica de N₂ y se le ha

denominado a esta enzima como una nodulina tardía (Silvente *et al.*, 2002). El nódulo al recibir un flujo constante de sacarosa podría estar induciendo la expresión de genes que codifican para la síntesis de trehalosa, ya que se ha demostrado la inducción en la producción de T6P y de la inducción de genes que codifican para TPSs (TPSs clase II) como respuesta a la adición de sacarosa (Müller *et al.*, 1998; Schluepmann *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003; Osuna *et al.*, 2007; Lunn, 2008; Paul, 2008). Esto concuerda con las bases de datos de ESTs de varias leguminosas durante la interacción simbiótica, ya que se han reportado únicamente la acumulación de transcritos correspondientes a secuencias codificantes para TPSs clase II (Pontius *et al.*, 2003).

La inducción de la expresión de genes que codifican para TPSs clase II durante la interacción simbiótica de las leguminosas con los rhizobia y la acumulación de trehalosa, principalmente en el nódulo, sugiere que el flujo constante de sacarosa hacia este, así como su desarrollo y diferenciación son los factores predominantes que dan lugar a esta inducción. Sin embargo, la participación papel de los rhizobia es importante, ya que al establecer la interacción simbiótica entre estos y la leguminosa, se da lugar al desarrollo del nódulo para ser el reservorio de los rhizobia y establecer el ambiente apropiado para la fijación biológica del N₂. El desarrollo, diferenciación, y mantenimiento del nódulo requieren de recursos en forma de carbohidratos así como una regulación estricta de los mismos por parte de la leguminosa (Aeschbacher *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2001b; Xie *et al.*, 2003). La coordinación del desarrollo y diferenciación de los nódulos se puede llevar a cabo por la sacarosa que es transportada y metabolizada en el nódulo, aunado a la inducción de genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de trehalosa, concretamente las TPS clase II y la trehalasa, para así probablemente producir T6P y trehalosa con una sola enzima, y mediante la degradación de esta última regular la relación T6P/trehalosa en el nódulo (Aeschbacher *et al.*, 1999; Schluepmann *et al.*, 2003; Van Dijken *et al.*, 2004; Osuna *et al.*, 2007; Chary *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011). La síntesis de trehalosa es crucial para el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular en las plantas, lo que sugiere, que el inducir, mantener y regular el metabolismo de trehalosa en el nódulo es importante para el mismo, y para la relación simbiótica por consecuencia. Además, el metabolismo de trehalosa influye directamente sobre la distribución y la utilización de los fotoasimilados, y por ende en la utilización de los mismos en los órganos sumidero o consumidores de carbohidratos, como es el caso del nódulo (Schluepmann & Paul, 2009).

En *P. vulgaris* se ha reportado la inducción de transcritos, por medio de análisis de ESTs durante la interacción simbiótica o estrés abiótico, de genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de trehalosa, concretamente para una TPS clase II (EST CV542030) y la trehalasa (EST CV535738). Estas enzimas, en el nódulo de la leguminosa, al parecer son las encargadas de producir T6P y trehalosa, y degradar a la trehalosa; respectivamente. La producción y degradación de trehalosa, así como de T6P, son importantes para el desarrollo y diferenciación para un órgano como el nódulo. El nódulo, aun siendo un órgano dispensable, es importante porque brinda las condiciones apropiadas para que los rhizobia puedan efectúen la fijación biológica de N₂. Por ende, el metabolismo de trehalosa, la producción de T6P, y la regulación de la relación T6P/trehalosa, probablemente requiera de la expresión coordinada de TPS clase II y de la trehalasa, que probablemente lleva a cabo la síntesis de T6P y trehalosa, y la trehalasa para regular la relación T6P/trehalosa durante el desarrollo y diferenciación del nódulo (Ramírez *et al.*, 2005; Tejera Garcia *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007).

Actualmente, la participación de las TPS clase II y la trehalasa en los nódulos de leguminosas aun no ha sido determinada, lo que da lugar al planteamiento de determinar la participación de los mismos en *P. vulgaris* mediante el uso de la tecnología de silenciamiento génico por medio de ARN interferente (RNAi) para abatir la acumulación de ARNm de la TPS clase II y la trehalasa; así como también determinar la función de la T6P sobre-expresando una TPS heteróloga de origen procariota. En el caso de *P. vulgaris* se pueden generar raíces transgénicas estables, mediante la transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* K599, lo que ayuda a restringir la transformación genética a las raíces y a los nódulos producidos en las mismas al interactuar con los rizobia (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007; Valdés-López *et al.*, 2008). Además, al restringir la transformación genética a las raíces y a los nódulos producidos en las mismas, se puede determinar el efecto de modificar la expresión de un gen sólo en la raíz y los nódulos; sin alterar otras etapas de desarrollo de la planta, como serían el desarrollo embrionario y vegetativo en la parte aérea. Al modificar la expresión génica de la TPS clase II y la trehalasa en *P. vulgaris* mediante el uso de RNAi, se alterarán los niveles de T6P y trehalosa en la raíz transgénica y el nódulo producido en la misma. Concretamente, al silenciar la TPS clase II afectará directa y negativamente sobre la producción de T6P y trehalosa; al silenciar la trehalasa la degradación de trehalosa disminuirá, promoviendo la acumulación de este metabolito; y por último, el sobre-expresar una TPS clase I o una TPS heteróloga de origen procariota dará lugar al aumento en la producción de T6P. Lo que ayudará a caracterizar directamente la participación del metabolismo de trehalosa en los nódulos de *P. vulgaris*, lo que a su vez podría ser extrapolado al resto de las leguminosas, y las implicaciones del mismo durante la interacción simbiótica, así como los posibles efectos sobre el resto de la leguminosa al modificar el metabolismo de trehalosa en la raíz. Finalmente, la modificación del metabolismo de trehalosa, abrirá el camino para el diseño de nuevas estrategias basada en la señalización de azúcares para el mejoramiento de especies de importancia agrícola y alimentaria.

HIPÓTESIS

La modificación en la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de la trehalosa en el nódulo de *P. vulgaris* podrían influir directamente en la relación simbiótica con *R. etli*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la modificación del metabolismo de trehalosa en el nódulo de frijol y de los bacteriodes dentro de las células infectadas (ganancia y pérdida de función).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Análisis bioinformático y escrutinio de las bases de datos para localizar secuencias correspondientes a las TPSs, las TPPs y la trehalasa de *P. vulgaris* presentes durante la simbiosis.
- Aislamiento y clonación de 300 pb de la región 3'-no traducida correspondiente a la TPS clase II encontrada (*PvTPS6c2*, EST CV542030), y de 220 pb de la región 3'-codificante de la trehalasa (*PvTRE1*, EST CV535738) para su silenciamiento mediante ARN interferente (RNAi) de estos genes (pérdida de función); y del marco de lectura abierto de *ReTPS* de *R. etli* para su sobre-expresión heteróloga (ganancia de función) en raíces y nódulos de *P. vulgaris*.
- Generar raíces transgénicas de frijol (o plantas compuestas de frijol) por medio de la inoculación de *A. rhizogenes* K599 (y las distintas cepas generadas) acorde al protocolo desarrollado y establecido por el grupo del Dr. Federico Sánchez (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007); e interaccionar con *R. etli* para la generación subsecuente de nódulos (transgénicos).
- Medir niveles de silenciamiento mediado por RNAi con el uso de qRT-PCR de la TPS clase II (*PvTPS6c2*) y la trehalasa (*PvTRE1*), así como analizar el perfil de carbohidratos en los nódulos transgénicos generados con las cepas de *A. rhizogenes* K599 para ganancia de función, pérdida de función y controles.
- Analizar, por medio de microscopía óptica y microscopía electrónica, las diferencias fenotípicas a nivel de estructura y de ultra-estructura celular de los nódulos transgénicos y de los bacterioides en los mismos generados para ganancia y pérdida de función.
- Análisis de parámetros fisiológicos (biomasa, tamaño, área foliar, peso fresco, contenido relativo de agua) de los nódulos transgénicos generados y de la parte aérea (hojas) de las plantas compuestas; y realizar análisis del perfil de carbohidratos.

METODOLOGÍA

CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

En este estudio se utilizó el frijol (*P. vulgaris*) cv. Negro Jamapa 81. Las semillas de *P. vulgaris* fueron esterilizadas, y después germinadas en condiciones estériles durante dos días, para transferirlas finalmente a macetas con vermiculita (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). Las plantas se crecieron en un invernadero con ambiente controlado (26-28°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), y fueron irrigadas con la solución nutritiva B&D (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). La generación de plantas compuestas de *P. vulgaris* fue acorde al protocolo desarrollado por Estrada-Navarrete *et al.*, (2007). Las raíces peludas o “Hairy-roots”, que emergieron del sitio de infección con *A. rhizogenes* K599, a las dos semanas después de la infección presentaron una longitud de 3-6 cm. Después de confirmar la presencia de los genes reporteros, por la emisión de luz verde (GFP) o roja (TdT) al exponer las raíces al microscopio de epifluorescencia, el sistema radical principal (no modificado genéticamente) se cortó, para después plantar las plantas compuestas de *P. vulgaris* en macetas con vermiculita. Inmediatamente después de haber transferido las plantas compuestas de *P. vulgaris* a las macetas con vermiculita, cada raíz transformada fue inoculada adicionando directamente 1 mL de cultivo líquido de *R. etli* CFN42. Las plantas compuestas de *P. vulgaris* interaccionando con *R. etli* CFN42 permanecieron durante 21 días en un invernadero con ambiente controlado e irrigadas con la solución nutritiva B&D sin nitrógeno. Después del periodo de interacción entre las plantas compuestas de *P. vulgaris* y *R. etli* CFN42 de 21 días, las raíces y los nódulos transgénicos fueron colectados y colocados inmediatamente en nitrógeno líquido, para almacenarse a 80°C bajo cero, hasta ser usados para análisis de acumulación de transcritos mediante qRT-PCR, y el análisis de los carbohidratos solubles por medio de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Además, los nódulos transgénicos que no fueron colocados en nitrógeno líquido, se fijaron inmediatamente en la resina LR-White para microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

La cepa bacteriana *R. etli* CFN42 se creció en medio líquido PY estéril [0.5% bactopectona (p/v), 0.3% extracto de levadura (p/v), 7mM CaCl₂·2H₂O] con ácido nalidíxico (20 µg/mL), como antibiótico de selección, a una temperatura de 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de $5-8 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). La cepa bacteriana *A. rhizogenes* K599 se creció en medio sólido LB estéril [1% bactopectona (p/v), 0.5% extracto de levadura (p/v), 1% NaCl (p/v), 1.5% agar (p/v)] sin antibiótico de selección, a una temperatura de 30°C durante 24 horas. Las cepas bacterianas de *A. rhizogenes* K599 con las construcciones pBGWFS7_PvTPS6c2PR, pBGWFS7_PvTRE1PR, pTdT-DC-RNAi, pTdT-GUS-RNAi, pTdT-PvTPS6c2-RNAi y pTdT-PvTRE1-RNAi se crecieron en medio sólido LB estéril con el antibiótico de selección espectinomomicina a una concentración de 200 µg/mL, a una temperatura de 30°C durante 24 horas. La cepa bacteriana *A. rhizogenes* K599 con el vector pCAMBIA-1304 y pCAMRT2 se crecieron en medio sólido LB estéril con el antibiótico de selección kanamicina a una concentración de 50 µg/mL, a una temperatura de 30°C durante 24 horas. Todas las cepas bacterianas de *A. rhizogenes* K599 se usaron para generar plantas compuestas de *P. vulgaris* acorde al protocolo establecido por Estrada-Navarrete *et al.*, (2007).

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DEL METABOLISMO DE TREHALOSA EN FRIJOL

Se identificaron secuencias de expresión etiquetadas (ESTs) de los genes involucrados en la síntesis y la degradación de trehalosa en el Common Bean Gene Index v.4.0 (DFCI, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), además se identificaron sus respectivas regiones codificantes, y se identificaron las regiones promotoras de dos genes del metabolismo de trehalosa que fueron identificados durante la interacción con *Rhizobium* y el estrés abiótico (Ramírez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007), por medio del análisis del borrador del genoma de *P. vulgaris* (Phytozome v8.0, <http://www.phytozome.net>; Mazorka, <http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/blast/>). Las secuencias codificantes de los genes del metabolismo de trehalosa (síntesis y degradación) fueron analizadas con el uso de “Pfam” en el sitio web del Instituto Sanger, y comparadas con otras secuencias de TPSs, TPPs y trehalasas depositadas en el “GenBank” con el uso de la herramienta de alineamiento múltiple “Blastx” en el sitio web del Centro Nacional para la Información en Biotecnología de Estados Unidos (NCBI). El alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes del metabolismo de trehalosa, y su análisis filogenético con el método de “Neighbor-Joining” y 1000 replicas de análisis estadístico mediado por “bootstrap” se realizó con la paquetería bioinformática de MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

MODELAMIENTO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PvTPS6c2 (DOMINIO TPS Y DOMINIO TPP) Y DE PvTRE1

El alineamiento de las secuencias de las proteínas codificadas por los marcos de lectura designados para PvTPS6c2 y PvTRE1 (seleccionados porque se detectaron secuencias de ESTs correspondientes a los mismos durante la interacción con *Rhizobium* y el estrés abiótico (Ramírez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007)) fueron realizados con el uso del programa ClustalX (2.0.10). Los alineamientos obtenidos se ajustaron a los datos de modelamiento para PvTPS6c2 (dominio TPS y dominio TPP) y PvTRE1. El modelamiento del dominio TPS de PvTPS6c2, del dominio TPP de PvTPS6c2 y de PvTRE1 se realizaron con el uso de “Swiss-model” (<http://swissmodel.expasy.org>), tomando como base la estructura tridimensional reportada para OtsA de *E. coli* con el código de acceso de PDB 1UQU (Gibson *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2004); la estructura tridimensional reportada para OtsB de *T. acidophilum* con el código de acceso de PDB 1U02 (Rao *et al.*, 2006); y la estructura tridimensional reportada para la trehalasa de *E. coli* con el código de acceso de PDB 2WYN, respectivamente. La visualización de los modelos tridimensionales, así como el cálculo de las distancias entre los átomos de la estructura tridimensional generada con respecto a la estructura cristalográfica molde o “RMSD” de los dominios TPS y TPP de PvTPS6c2, y de PvTRE1 fue mediante el programa PyMol (DeLano, 2002).

CONSTRUCCIONES GENERADAS PARA LA GENERACIÓN DE PLANTAS COMPUESTAS DE FRIJOL

Para realizar las construcciones para analizar las regiones promotoras de *PvTPS6c2* y de *PvTRE1* se diseñaron los respectivos oligonucleótidos; las secuencias de las regiones promotoras de *PvTPS6c2* y de *PvTRE1* se obtuvieron del borrador del genoma de *P. vulgaris* (Phytozome, <http://www.phytozome.net>; y Mazorka, <http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/blast/>). La secuencia

correspondiente a la región promotora de *PvTPS6c2*, de 1600 pb, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso del oligonucleótido hacia adelante (*PvTPSc2PromFor*: CACCGAGCAATGCATCTGGGTCCCACAAGTGA) y del oligonucleótido reverso (*PvTPSc2PromRev*: CCTTGTGCCTTCTAATTACTCACAAGGTCTCC). La secuencia correspondiente a la región promotora de *PvTRE1*, de 1900 pb, se amplificó mediante PCR con el uso del oligonucleótido hacia adelante (*PvTRE1PromFor*: CACCGGGTACATGTGTAATTACAATAAACTTCAA) y del oligonucleótido reverso (*PvTRE1PromRev*: GAAAATGTGGCAATGAATTGATGAAAGAGAAG). Las secuencias correspondientes a las regiones promotoras de *PvTPS6c2* y de *PvTRE1* amplificadas por PCR se clonaron en el vector pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.) y fueron secuenciados. Las construcciones resultantes pENTR-PvTPS6c2PR y pENTR-PvTRE1PR se recombinaron independientemente, con el uso del sistema Gateway™ (LR-Clonase, Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.), hacia el vector binario pBGWFS7 (Karimi *et al.*, 2007), resultando las construcciones pBGWFS7_PvTPS6c2PR y pBGWFS7_PvTRE1PR (Figura S1). Para amplificar por medio de PCR la región codificante de la TPS del cromosoma de *R. etli* CFN42 se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes. La secuencia única de 1407 pb correspondiente a *ReTPS* se amplificó con el oligonucleótido hacia adelante (*ReTPSFor*: CCATGGGCCGTCTTATCGTCGTTTCCAATCG) y el oligonucleótido reverso (*ReTPSRev*: AGATCTGATCCGTGCGCCCCGCTCCCATC), y se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.) y fue secuenciado. La construcción resultante pCReTPS se sometió a ensayos de restricción con las enzimas *NcoI* y *BglIII* para liberar el fragmento correspondiente a *ReTPS* y subclonarlo en el vector pCAMBIA-1304 (previamente sometido a ensayos de restricción con las enzimas *NcoI* y *BglIII*) mediante una reacción de ligación con la T4-DNA-Ligasa (Fermentas Life Sciences, Waltham, Massachusetts, U.S.A.) y generar la construcción de sobre-expresión de *ReTPS* denominada pCAMRT2 (*ReTPS::GFP:GUSa*) (Figura S3). Para generar las construcciones de silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia (RNAi) para la región 3'-no traducida (3'-UTR) de *PvTPS6c2* (*PvTPS6c2Ri*) se amplificó por PCR 300 pb de esta región con el uso del oligonucleótido hacia adelante (*PvTPS6c2RiFor*: CACCGATGGTGGTGATGGTGAGAGGTATTATTAC) y el oligonucleótido reverso (*PvTPS6c2RiRev*: TAGCATCAATGGTTGAAAGGAATGCAGAACAAGAG); y para la región 3'-codificante de *PvTRE1* (*PvTRE1Ri*) se amplificó por PCR 220 pb de esta región con el uso del oligonucleótido hacia adelante (*PvTRE1RiFor*: CACCGAAGGCCTTCTAAAATCTGGGTTGC) y el oligonucleótido reverso (*PvTRE1RiRev*: CAAACGTTTCCCTAGACCAAAAAGAATAATGTTG). Los fragmentos amplificados fueron clonados independientemente en el vector pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.) y fueron secuenciados. Las construcciones resultantes pENTR-PvTPS6c2Ri y pENTR-PvTRE1Ri se recombinaron independientemente, con el uso del sistema Gateway™ (LR-Clonase, Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.), hacia el vector binario pTdT-DC-RNAi (Valdés-López *et al.*, 2008). La orientación apropiada de los fragmentos correspondientes a *PvTPS6c2Ri* y *PvTRE1Ri* clonados en pTdT-DC-RNAi se verificaron por medio de PCR; en el caso de pTdT-PvTPS6c2-RNAi se usó el oligonucleótido reverso WRKY-5-Rev (GCAGAGGAGGAGAAGCTTCTAG) o el oligonucleótido hacia adelante WRKY-3-Fwd (CTTCTCCAACCACAGGAATTCATC) con el oligonucleótido hacia adelante *PvTPS6c2RiFor*; para la construcción pTdT-PvTRE1-RNAi se usó el oligonucleótido reverso WRKY-5-Rev o el oligonucleótido hacia adelante WRKY-3-Fwd con el oligonucleótido hacia adelante *PvTRE1RiFor*

(Figura S2). Las construcciones resultantes pBGWFS7_PvTPS6c2PR, pBGWFS7_PvTRE1PR, pCAMRT2, pTdT-PvTPS6c2-RNAi, y pTdT-PvTRE1-RNAi; y los vectores control pCAMBIA-1304, pTdT-DC-RNAi, y pTdT-GUS-RNAi se introdujeron en *A. rhizogenes* K599 mediante electroporación (Tabla S1). Las cepas bacterianas de *A. rhizogenes* K599 (Tabla S2) se utilizaron para la generación de raíces transgénicas o plantas compuestas de *P. vulgaris* acorde al protocolo establecido por Estrada-Navarrete et al., (2007). Las probables raíces transformadas fueron confirmadas al ser expuestas en el microscopio de epifluorescencia y detectar la emisión de fluorescencia verde o roja, como resultado de la expresión de las proteínas reporteras GFP o TdT dependiendo la construcción o vector. Las plantas compuestas de *P. vulgaris* fueron transferidas a un invernadero para interactuar con *Rhizobium*, como se describió anteriormente.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *PvTPS6c2* y *PvTRE1* EN RAÍCES NODULADAS DE FRIJOL

Con el uso de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con la construcción pBGWFS7_PvTPS6c2PR y con las plantas compuestas de *P. vulgaris* con la construcción pBGWFS7_PvTRE1PR interactuando con *Rhizobium* durante 21 días en el ambiente controlado del invernadero e irrigadas con solución nutritiva B&D sin nitrógeno. Después de los 21 días mencionados, las raíces junto con sus nódulos transgénicos fueron colectados para realizar el ensayo de GUS. Las raíces junto con sus nódulos transgénicos se incubaron en el buffer X-Gluc (5x GUS-buffer, 100 ml: 250 mg X-Gluc, 0.1 g Tritón X-100, 82.3 mg ferricianuro de potasio [K₃Fe(CN)₆, M = 329.9 g·mol⁻¹], 105.6 mg ferrocianuro de potasio [K₄Fe(CN)₆·3H₂O, M = 422.4 g·mol⁻¹] a una concentración de 50mM en buffer de fosfatos) a una temperatura de 37°C durante 10 horas, para después someter a clarificación de los tejidos sumergiendo los mismos en una solución de acetona:metanol en proporción 1:3.

MICROSCOPIA CONFOCAL

Las muestras de nódulos y raíces fueron analizadas mediante microscopía confocal. Las imágenes de microscopía confocal se tomaron con el uso de un microscopio confocal láser LSM510 (Carl Zeiss, Thornwood, New York, U.S.A.). Las imágenes de microscopía confocal fueron procesadas con el uso de Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, California, U.S.A.). Para la observación de las muestras en tiempo real, se utilizó el microscopio de epifluorescencia Axioscop Zeiss (Carl Zeiss, Thornwood, New York, U.S.A.) acoplado al sistema de microscopía.

MICROSCOPIA ÓPTICA

Los nódulos colectados se embebieron en la resina LR-White (9 nódulos por experimento), previamente fijados ρ -formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0.4% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), seguido de una deshidratación serial con etanol. Las muestras fueron teñidas con azul de Toluidina. Se prepararon secciones de 7 μ m con un ultramicrotomo (Leica Ultracut R, Vienna, Austria). El análisis de los nódulos fue con el uso de un microscopio óptico (Motic BA300, Xiamen, China) acoplado a una cámara digital para la captura de imágenes (Motic M1000, Xiamen, China).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los nódulos colectados se embebieron en la resina LR-White (9 nódulos por experimento), previamente fijados en ρ -formaldehído al 2% con glutaraldehído al 0.4% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), seguido de una deshidratación serial con etanol. Las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo. Se prepararon secciones delgadas de 60 nm con un ultramicrotomo (Leica Ultracut R, Vienna, Austria). El análisis de la ultra-estructura de los nódulos por medio de microscopía electrónica de transmisión se realizó con el uso del microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM900 (Gatan, Inc., Pleasanton, California, U.S.A.) con un sistema de cámaras de visión dual acoplado.

DETERMINACIÓN DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA DE *Rhizobium* RE-AISLADOS DE NÓDULOS

Se aislaron los nódulos de las raíces, y después la superficie de los mismos se esterilizó al sumergirlos durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v), para después homogeneizarlos con una punta plástica en 5 volúmenes de $MgCl_2$ 100 mM. Al tener los nódulos homogeneizados se procedió a realizar diluciones seriales de 10^0 - 10^{-8} , para después platear 100 μ L en medio sólido PY con ácido nalidíxico 20 μ g/mL a 30°C durante 24 horas para realizar el conteo de colonias.

ANÁLISIS DEL PERFIL DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES CON CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPEÑO

Hojas, tallos, raíces y nódulos fueron colectados, pesados, y congelados en nitrógeno líquido para pulverizarlos en un mortero, y así poder extraer todos los carbohidratos solubles (azúcares) con 1 mL de etanol al 80% (v/v) durante 10 minutos, con agitación, a una temperatura de 80°C. El sobrenadante se secó mediante evaporación para disolverse en 1 mL de agua grado HPLC, e inmediatamente filtrar con una membrana de 0.22 μ m para limpiar las impurezas. Los extractos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) con un sistema controlador Waters-600E (Waters, Milford, Massachusetts, U.S.A.), equipado con un detector de índice de refracción Waters 410 (Waters, Milford, Massachusetts, U.S.A.) y una columna para análisis de carbohidratos (Kromasil NH2-5 μ m, Supelco, St. Louis, Missouri, U.S.A.). La temperatura de la columna se mantuvo constante a 35°C, y la fase móvil utilizada fue acetonitrilo:agua en proporción 80:20 con un flujo constante de 1.2 mL·minuto⁻¹. Soluciones de 1 mg·mL⁻¹ o 1000 μ g·mL⁻¹ de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y trehalosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.) fueron utilizados como estándares. Mediante el uso de curvas estándar se cuantificaron los carbohidratos solubles, los índices de correlación que se determinaron en las curvas estándares presentaron un rango de 0.9865 a 0.9928. Los resultados de la cuantificación de carbohidratos solubles se expresaron en μ g·mg de peso fresco⁻¹.

DETERMINACIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La determinación de la fijación de nitrógeno se realizó con el ensayo de la reducción de acetileno (Vessey, 1994). Se tomaron raíces noduladas de 21 dpi, de plantas compuestas de frijol (9 plantas por experimento), y se colocaron en frascos de 160 mL sellados con un tapa de hule. Después, se retiraron

4 mL de aire de los frascos de 160 mL, el cual se re-emplazó con gas acetileno. La producción de etileno se determinó por medio del uso de un cromatógrafo de gases, y las unidades en las que se expresó su cuantificación fueron en nanomoles de etileno por minuto por peso fresco de los nódulos (g).

ANÁLISIS DE ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS POR qRT-PCR

Para aislar ARN total de nódulos de 21 días post-inoculación, para el análisis de acumulación de transcritos por qRT-PCR, se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.). Para el análisis de acumulación de transcritos por qRT-PCR, el ARN total aislado eso trató con “DNaseI” (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.) para remover el ADN genómico. Para determinar la ausencia de ADN genómico en el ARN total, después de ser tratado con “DNaseI”, fue mediante una reacción de PCR tomando como templado el ARN total y sometido a 40 ciclos con el mismo programa de PCR del qRT-PCR con el uso de una polimerasa Taq-DNA (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.A.). Para los análisis de acumulación de transcritos se utilizó el sistema “LightCycler®480” (Roche, Penzberg, Germany). Las reacciones de qRT-PCR se realizaron acorde al protocolo y el paquete de síntesis de ADNc “First Strand cDNA Synthesis kit” en conjunto con el protocolo y el paquete para reacciones de qRT-PCR “Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2x)” (Fermentas Life Sciences, Waltham, Massachusetts, U.S.A.). Controles sin ADN templado se incluyeron en cada análisis. Cada muestra se analizó por triplicado, y los datos fueron normalizados con respecto al gen de referencia *factor de elongación 1- α* de *P. vulgaris* (*PvEF1 α*) (Livak & Schmittgen, 2001). Los resultados del análisis de acumulación de transcritos presentados corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), y estos resultados se sometieron al análisis estadístico de la prueba de *t* de Student a 2 colas no pareada para determinar la validez de la diferencia de acumulación de transcritos.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DE TREHALOSA EN LEGUMINOSAS

En la base de datos de UNIGENE (Pontius *et al.*, 2003), parte del sitio web de NCBI, se buscaron las secuencias etiquetadas de expresión (ESTs) correspondientes a los genes del metabolismo de trehalosa (síntesis y degradación) en varias leguminosas (*P. vulgaris*, *G. max*, *M. truncatula*, y *L. japonicus*). Además, esta base de datos nos proporcionó los datos de comparación de los ESTs con sus respectivas secuencias homólogas, y el número de ESTs reportados. Los ESTs de los genes del metabolismo de trehalosa se muestran en la Tabla 2. Los genes del metabolismo de trehalosa que corresponden a los ESTs de la base de datos de UNIGENE son TPSs clase II (síntesis), TPPs (síntesis), y trehalasas (degradación). Para frijol (*P. vulgaris*) en la base de datos de UNIGENE sólo hay reportes de 3 ESTs que corresponden a una TPS clase II (AtTPS7). *L. japonicus* sólo presentó reportes para genes de síntesis de trehalosa, estos corresponden a TPSs clase II (AtTPS5, AtTPS7, AtTPS11, CrTPS/TPP, SmTPS), y TPPs (AtTPPA, CrTPP). Para *G. max* y *M. truncatula* hay reportes para genes de síntesis y degradación de trehalosa, correspondientes a TPSs clase II (AtTPS7; ambos casos), TPPs (AtTPPA, CrTPP; ambos casos), y trehalasas (AtTRE1; ambos casos).

De la base de datos de UNIGENE el grupo de ESTs menos diverso y que sólo incluyó a una probable TPS clase II correspondió a los reportados para *P. vulgaris*. Los grupos de ESTs más diversos, que incluyeron genes de síntesis (TPSs clase II, TPPs) y degradación (trehalasa) de trehalosa correspondieron a los reportados para *G. max* y *M. truncatula*. Es de resaltar la ausencia de reportes de ESTs que pudieran corresponder a TPSs clase I.

En *P. vulgaris*, también se ha reportado la expresión de una TPS clase II durante la nodulación (Ramírez *et al.*, 2005), que corresponde al EST CV542030 de la base de datos del “Common Bean Gene Index” v.4.0. (DFCI, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). Además, con el uso de esta base de datos se pudieron identificar ESTs correspondientes a TPSs clase I, TPSs clase II, TPPs y para trehalasas (Tabla 3). Los ESTs que corresponden a las TPSs clase I se aislaron de tallos, hojas y vainas. Los ESTs que corresponden a las TPSs clase II se aislaron de pelos radicales, nódulos, raíces, tallos, hojas, vainas y semillas. Los ESTs que corresponden a las TPPs se aislaron de tallos y hojas. Los ESTs que corresponden a trehalasas se aislaron sólo de nódulos (Tabla 3).

De acuerdo con los datos obtenidos en las bases de datos de ESTs para *P. vulgaris* (“Common Bean Gene Index v.4.0”, DFCI, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), los ESTs que corresponden a genes del metabolismo de trehalosa aislados de nódulos son los que codifican para TPS clase II y la trehalasa. Sin embargo, con el uso de los ESTs reportados para *P. vulgaris* y con las bases de datos del borrador del genoma de *P. vulgaris* (Phytozome v8.0, <http://www.phytozome.net>; Mazorka, <http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/blast/>) como herramientas utilizadas para la identificación de los genes del metabolismo (síntesis y degradación) de trehalosa en el genoma de *P. vulgaris*, así como la identificación de las regiones codificantes de los genes, la deducción de las secuencias de amino ácidos correspondientes a las enzimas codificadas por estos genes, realizar el análisis de estas secuencias deducidas para determinar dominios funcionales, deducir la estructura tridimensional, y llevar a cabo su análisis filogenético.

Tabla 2. Datos de secuencias expresadas etiquetadas (ESTs) de distintas leguminosas (Pontius *et al.*, 2003). Indicando a que genes son homólogos, nombre del identificador en la base de datos, porcentaje de identidad a sus homólogos, y cantidad de ESTs reportados relacionados.

Organismo	TPS	UniGene ID	Identidad (%)	No. Secuencias Relacionadas
<i>Phaseolus vulgaris</i>	AtTPS7	Pvu.10646	77.00%	3
<i>Glycine max</i>	AtTPS7	Gma.19738	79.60%	35
<i>Medicago truncatula</i>	AtTPS7	Mtr.12443	75.50%	16
<i>Lotus japonicus</i>	AtTPS5	Lja.7316	75.30%	19
<i>Lotus japonicus</i>	AtTPS7	Lja.5771	78.50%	6
<i>Lotus japonicus</i>	AtTPS7; CrTPS/TPP	Lja.23072	77.70% - 48.00%	3
<i>Lotus japonicus</i>	SmTPS; AtTPS11	Lja.21813	67.00% - 55.80%	2
Organismo	TPP	UniGene ID	Identidad (%)	No. Secuencias Relacionadas
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-	-	-
<i>Glycine max</i>	AtTPPA; CrTPP	Gma.22700	81.40% - 54.0%	5
<i>Medicago truncatula</i>	AtTPPA; CrTPP	Mtr.7540	75.80% - 47.40%	14
<i>Lotus japonicus</i>	AtTPPA; CrTPP	Lja.12020	78.60% - 45.10%	3
<i>Lotus japonicus</i>	AtTPPA; CrTPP	Lja.20321	85.00% - 51.80%	5
<i>Lotus japonicus</i>	AtTPPA	Lja.20919	57.00%	4
Organismo	TRE1	UniGene ID	Identidad (%)	No. Secuencias Relacionadas
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-	-	-
<i>Glycine max</i>	AtTRE1	Gma.136	64.00%	32
<i>Medicago truncatula</i>	AtTRE1	Mtr.15545	62.10%	4
<i>Lotus japonicus</i>	-	-	-	-

Tabla 3. Datos de secuencias expresadas etiquetadas (ESTs) de frijol (Common Bean Gene Index v.4.0, DFCI, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). Indicando a que genes son homologas, cantidad de ESTs reportados, y en que órgano se determinó la presencia de los ESTs.

Gen Metabolismo de Trehalosa	Cantidad ESTs Reportados	Organos de Expresión de ESTs
TPS Clase I	11	Tallo, hoja, vaina
TPS Clase II	144	Pelos radicales, nódulo, raíz, tallo, hoja, vaina y semilla
TPP	10	Tallo y hoja
Trehalasa	3	Nódulo

2. GENES DEL METABOLISMO DE TREHALOSA EN FRIJOL

En el genoma de *P. vulgaris*, con el uso de los ESTs reportados en la base de datos de Common Bean Gene Index v.4.0 (DFCI, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), se identificaron genes del metabolismo de trehalosa, lo cual concordó con los reportes de ESTs de esta base de datos. Fueron identificadas familias génicas para los genes de síntesis de trehalosa, y en cambio sólo se identificó un gen para la degradación de trehalosa. Las TPSs se encuentran agrupadas en dos familias; la familia de la TPS clase I está constituida por 4 miembros (Tabla 4 y S3), la familia génica de la TPS clase II está constituida por 7 miembros (Tabla 4 y S5). Las TPPs de *P. vulgaris* es una familia génica con dos integrantes (Tabla 4 y S7). La trehalasa posee sólo un integrante (Tabla 4 y S9), tal como se ha determinado para otras especies de plantas en las cuales se ha secuenciado su genoma (Lunn, 2007; Paul *et al.*, 2008). Las secuencias deducidas de amino ácidos de los genes del metabolismo de trehalosa en *P. vulgaris* se analizaron por medio de Pfam (The Sanger Institute, sitio web), y el resultado de este análisis se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de las secuencias deducidas de amino ácidos de los genes del metabolismo de trehalosa presentes en *P. vulgaris*.

Familia	Gen	Familia Pfam	Descripción Pfam	E-Value
TPS clase I	<i>PvTPS1c1</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	2.00E-99
	<i>PvTPS2c1</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	7.80E-21
		Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	2.80E-29
	<i>PvTPS3c1</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	4.90E-21
		Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	1.00E-27
	<i>PvTPS4c1</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	7.00E-85
TPS clase II	<i>PvTPS1c2</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	3.70E-185
		Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	2.70E-68
	<i>PvTPS2c2</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	5.20E-187
		Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	1.10E-72
	<i>PvTPS3c2</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	7.30E-181
		Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	9.00E-51
	<i>PvTPS4c2</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	3.50E-175
		Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	6.60E-71
	<i>PvTPS5c2</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	8.90E-173
	Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	5.20E-45	

Familia	Gen	Familia Pfam	Descripción Pfam	E-Value
	<i>PvTPS6c2</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	7.40E-183
		Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	1.20E-49
	<i>PvTPS7c2</i>	Glicosiltransferasa 20	Familia Glicosiltransferasa 20	4.00E-174
		Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	6.40E-74
TPP	<i>PvTPP1</i>	Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	1.70E-22
	<i>PvTPP2</i>	Trehalosa P-fosfatasa	Trehalosa-fosfatasa	9.10E-24
Trehalasa	<i>PvTRE1</i>	Trehalasa	Trehalasa	4.80E-162

3. *PvTRE1* (*PvTRE1*-RNAi)

3.1 EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DE TREHALOSA EN FRIJOL DURANTE LA INTERACCIÓN CON *Rhizobium*

En leguminosas se encontró la acumulación de transcritos de genes del metabolismo de trehalosa, mencionados en la Tabla 2 (Pontius *et al.*, 2003). En *P. vulgaris* se ha reportado la expresión del EST CV535738 el cual corresponde a la región 3'-codificante de *PvTRE1*, correspondiente a la trehalasa de *P. vulgaris* (Tabla 3 y 4).

La secuencia completa de *PvTRE1* se analizó por medio de “BlastX” (sitio web de NCBI) y “Blast” del borrador del genoma de *P. vulgaris*, con el uso de Phytozome y Mazorka (Phytozome v8.0, <http://www.phytozome.net>; Mazorka, <http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/blast/>). Además, se analizaron 2000 pb de la secuencia río arriba del codón de inicio de *PvTRE1*, a lo que se denominó región promotora, con PlantPan (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/gene_group/index.php) para determinar los sitios o cajas de unión de factores transcripcionales para activar la transcripción génica durante la nodulación (NODCON1/2GM). Se determinó la presencia de 40 secuencias reguladoras de la expresión génica diferentes, destacando ocho secuencias, o motivos, reguladoras de activación de la expresión génica durante la nodulación (NODOCO2NGM/OSE2ROOTNODULE) (Figura 9, Tabla 5). En p*PvTRE1* hay ocho secuencias de activación de la expresión génica durante la nodulación; son tres más que las encontradas en la secuencia de la región promotora de la *leghemoglobina A* de *P. vulgaris* (*PvLeghA*, 2 kb; la cual es una nodulina), la cual cuenta con cinco secuencias de activación de la expresión génica durante la nodulación.

Tabla 5. Listado de secuencias de unión de factores de transcripción en las regiones promotoras de *PvTRE1*.

p <i>PvTRE1</i> Secuencias Reguladoras	Frecuencia
AGL3	2
AG	2
Athb-1	12
ATHB-5	16
ATHB-9	6
AP1	1

pPvTRE1 Secuencias Reguladoras	Frecuencia
ARR10	2
ARR1AT	11
Agamous	1
AtMYB2	1
CAATBOX1	19
CATATGGMSAUR	1
CCA1ATLHCB1	1
CCA1	1
CCAATBOX1	1
Core	30
GAREAT	1
GATABOX	9
GT1CONSENSUS	11
GT1CORE	1
GT1GMSCAM4	2
HMG-1	8
LTRECOREATCOR15	2
MYB1AT	3
MYBATRD22	1
MYCATERD1	1
MYCCONSENSUSAT	6
NODCON2GM	8
OSE2ROOTNODULE	8
PEND	1
POLASIG1	9
RHERPATEXPA7	1
RYREPEATGMGY2	1
RYREPEATLEGUMINBOX	1
S1FBOXSORPS1L21	1
SEF4MOTIFGM7S	2
SORLIP1AT	2
SORLIP3AT	1
TATABOX2	2
TATABOX5	7

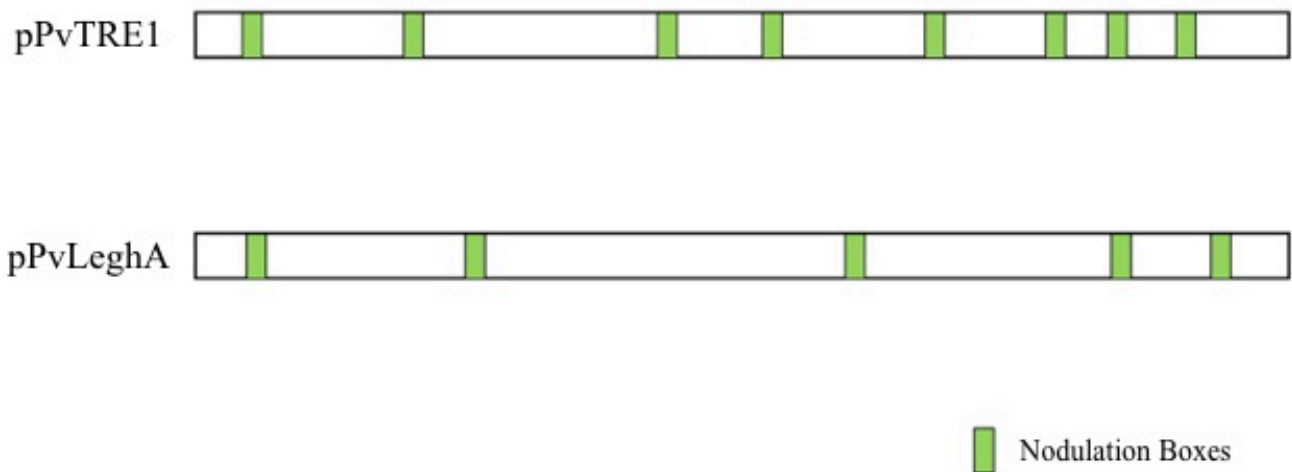


Figura 9. Presencia de secuencias o cajas reguladoras de activación de la expresión génica durante la nodulación presentes en *PvTRE1*, y *PvLeghA*. Las cajas, o motivos, presentes están resaltados en verde.

3.2 ESTRUCTURA GÉNICA, TRIDIMENSIONAL Y DISTRIBUCIÓN DE PvTRE1

La estructura génica de *PvTRE1* esta constituida por 10 exones y 9 intrones (Figuras 10 y 11). La secuencia deducida de amino ácidos confirmó la presencia de un único dominio de trehalasa, mediante el análisis en “Pfam” (Tabla 4). El dominio trehalasa corresponde a la totalidad de la secuencia deducida de amino ácidos, para agruparse en la familia de trehalasas con un valor de expectancia de 4.8×10^{-162} . *PvTRE1* se agrupó con las trehalasas vegetales (Figura 13). La región promotora del mismo presentó 8 cajas de unión de factores transcripcionales para activar la transcripción génica durante la nodulación (Figura 9).

PvTRE1 también presenta reportes de expresión (Ramírez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007). Este gen posee diez exones y nueve intrones, es el único gen que codifica para la enzima trehalasa. A partir de la secuencia deducida de amino ácidos, se pudo deducir su estructura tridimensional (Figura 10) (DeLano, 2002; Gibson *et al.*, 2007). El valor obtenido de “RMSD” al comparar su estructura tridimensional con la estructura cristalográfica de EcTREp de *E. coli* fue de 0.080 Å, sugiriendo alto grado de conservación de su estructura tridimensional con la estructura cristalizada de la proteína homóloga, y probablemente de función (Figura 10). *PvTRE1* presenta homología y se agrupa en el mismo clado de trehalasas vegetales (*AtTRE1* y *NtTRE1*), específicamente con las trehalasas de leguminosas *GmTRE1* y *MtTRE1* (Figura 13). Las trehalasas regulan directamente la cantidad de trehalosa presente en las células vegetales (así como en la células procariontas y eucariotas en general), y también se ha vinculado su participación en la defensa contra patógenos (Müller *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 2001a; Brodmann *et al.*, 2002; Tejera Garcia *et al.*, 2005; López *et al.*, 2009).

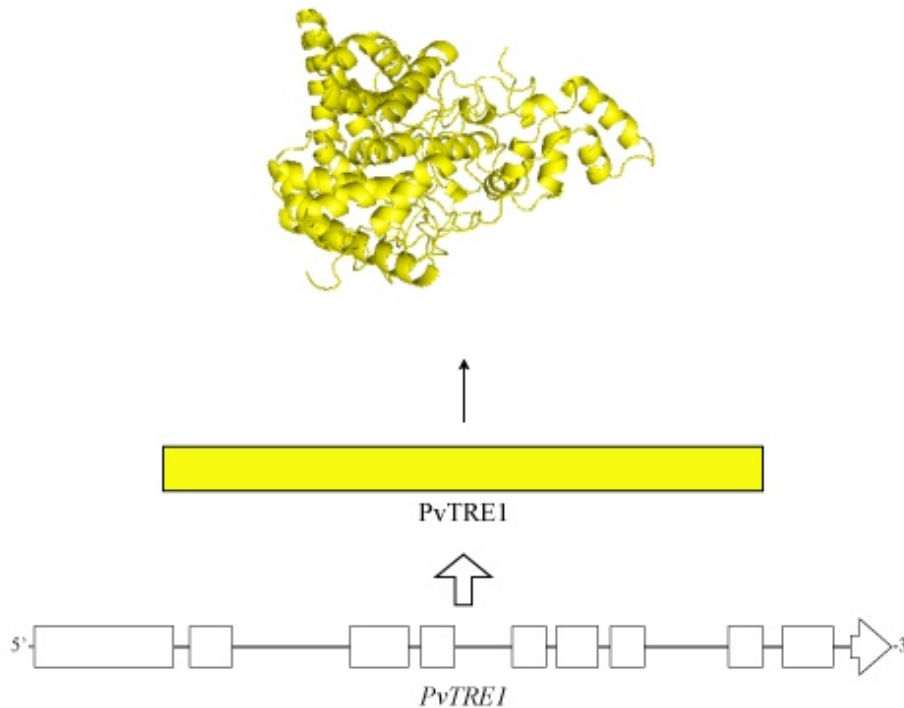


Figura 10. Estructura del gen, organización del dominio, y estructura tridimensional de *PvTRE1*. Estructura del gen de *PvTRE1* conformada por 10 intrones y 9 exones. El dominio trehalasa comprende toda la longitud de la secuencia deducida de amino ácidos de *PvTRE1*. La estructura tridimensional de *PvTRE1* fueron analizadas con PyMol 1.3 (DeLano, 2002), deducida a partir de la estructura cristalográfica de *EctREp* (2WYN). El código de acceso de PDB está entre paréntesis.

Con el uso de la base de datos de Phytozome v8.0 se analizaron las secuencias y la estructura génica de *PvTRE1* y de sus homólogos en *G. max* (*GmTRE1*), *M. truncatula* (*MtTRE1*) y *Arabidopsis* (*AtTRE1*); se determinó que *PvTRE1* poseen 10 exones y 9 intrón, *GmTRE1* y *MtTRE1* poseen 11 exones y 10 intrones, y *AtTRE1* posee 6 exones y 5 intrones (Figura 11).

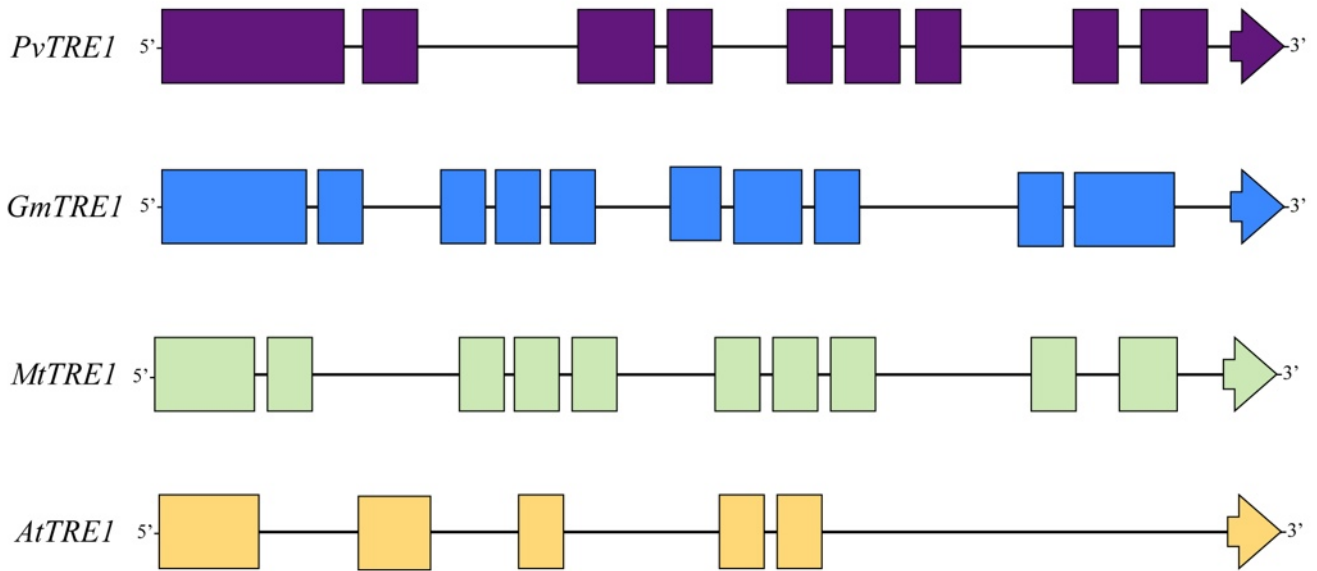


Figura 11. Estructura génica de *PvTRE1* y sus homólogos en *G. max*, *M. truncatula* y *Arabidopsis*.

La secuencia deducida de la trehalasa se alineó con sus respectivos homólogos de *Arabidopsis*, *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Xanthomonas campestris*, *Enterobacter sp*, *Magnaporthe grisea*, *Drosophila melanogaster*, *Erwinia amylovora*, *Spodoptera frugiperda*, *Homo sapiens*, *Ralstonia solanacearum*, *Magnaporthe oryzae*, *Danio rerio*, *Nicotiana tabacum*, *Apis mellifera*, *M. truncatula*, *Caenorhabditis elegans*, *Physcomitrella patens*, *Neurospora crassa*, *Laccaria bicolor*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora tetrasperma*, *Emericella nidulans*, *Metarhizium acridum*, *Candida albicans*, *Magnaporthe oryzae*, *G. max*, *Talaromyces emersonii*, *Metarhizium anisopliae*, *Spodoptera exigua*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* (Figura 12), y analizarlas por medio de MEGA5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

activo, morado sitios de fosforilación, azul dominio transmembranal (Aeschbacher *et al.*, 1999; Gibson *et al.*, 2007).

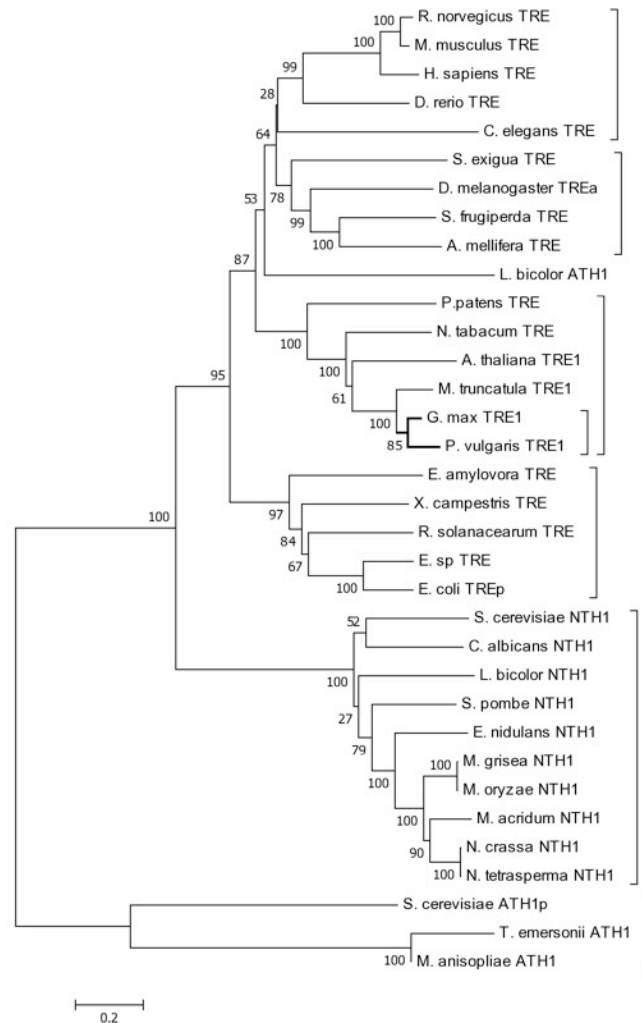


Figura 13. Árbol filogenético de trehalasa (PvTRE1) de *P. vulgaris*. PvTRE1 se comparó con sus correspondientes homólogos de *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *E. coli*, *X. campestris*, *E. sp*, *Magnaporthe grisea*, *Drosophila melanogaster*, *Erwinia amylovora*, *Spodoptera frugiperda*, *Homo sapiens*, *Ralstonia solanacearum*, *Magnaporthe oryzae*, *Danio rerio*, *N. tabacum*, *Apis mellifera*, *M. truncatula*, *Caenorhabditis elegans*, *Physcomitrella patens*, *Neurospora crassa*, *L. bicolor*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora tetrasperma*, *E. nidulans*, *Metarhizium acridum*, *Candida albicans*, *Glycine max*, *Talaromyces emersonii*, *M. anisopliae*, *Spodoptera exigua*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*.

El árbol filogenético generado del alineamiento de la trehalasa (PvTRE1) de *P. vulgaris* agrupó a esta en el mismo clado de las TREs de *G. max* (GmTRE1), *M. truncatula* (MtTRE1), *Arabidopsis* (AtTRE1) y *P. patens* (PpTRE). La agrupación de PvTRE1 con las TREs vegetales sugiere conservación a nivel de secuencia, así como una conservación acentuada con las TREs de leguminosas (Figura 13) (Aeschbacher *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2006).

3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PvTRE1 DURANTE EL DESARROLLO DE LOS NÓDULOS

El fragmento correspondiente a la región reguladora de la expresión génica de *PvTRE1* se amplificó mediante PCR, y se clonó en el vector pBGWFS7, para fusionar la región reguladora de la expresión génica con las secuencias codificantes de los genes reporteros de la *proteína verde fluorescente (GFP)* y la β -glucuronidasa (p*PvTRE1::GFP:GUS*). Con el fin de efectuar el análisis de expresión de *PvTRE1* mediante la tinción de las raíces noduladas por la actividad de degradación de 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucuronido (X-gluc) por GUS (Jefferson *et al.*, 1987).

Los ensayos de GUS en raíces noduladas indican que la expresión de *PvTRE1* es predominante en los nódulos (Figura 14). Este resultado confirma y está acorde con al análisis bioinformático (presencia de ocho motivos de activación de la expresión génica durante la nodulación) de la región reguladora de la expresión génica de *PvTRE1*.

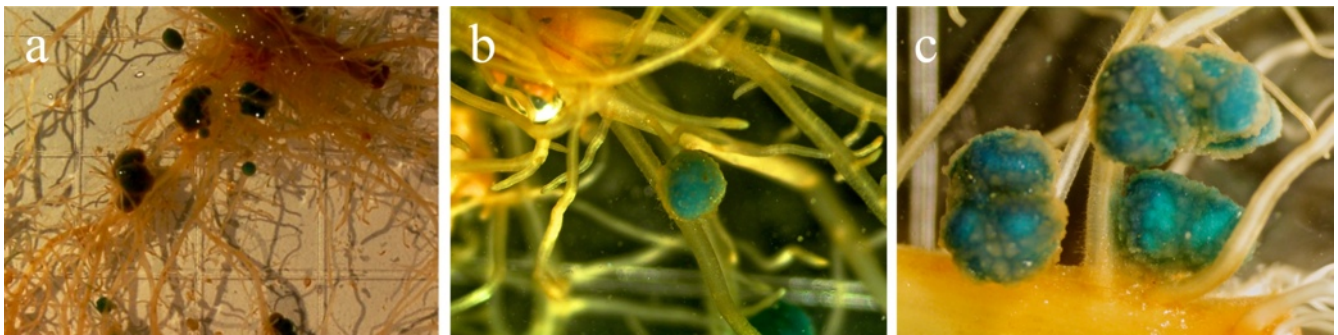


Figura 14. Análisis de expresión de *PvTRE1* en raíces noduladas (21 días después de la inoculación con *Rhizobium*) de *P. vulgaris*, con la fusión de la región reguladora de la expresión génica de *PvTRE1* al gen reportero *GUS*. a) Raíces noduladas después del ensayo de tinción de GUS. b-c) Acercamientos a los nódulos de las raíces de *P. vulgaris* después del ensayo de tinción de GUS.

Al determinar que la expresión de *PvTRE1* es predominante en los nódulos, se llevó a cabo la determinación del perfil de expresión de *PvTRE1*, así como el de carbohidratos solubles (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, y trehalosa) durante el desarrollo del nódulo. La determinación del perfil de expresión de *PvTRE1*, y de los carbohidratos solubles en los nódulos correspondió a muestras de 14 días post-inoculación (dpi) con *Rhizobium*, 21 dpi, 25 dpi, y 28 dpi. El perfil de expresión de *PvTRE1* se mantuvo sin cambios en sus niveles de expresión a los 21 dpi (con respecto a los 14 dpi); y después mostró un descenso de alrededor del 16% en sus niveles de expresión a los 25 dpi (con respecto a los 14 dpi), para finalmente, experimentar un incremento notable en sus niveles de expresión a los 28 dpi de un 264% (con respecto a los 14 dpi) (Figura 15). En comparación, se analizó la acumulación de transcrito de la nodulina sacarosa sintasa 1 (*PvSUS1*), a los 21 dpi su acumulación de transcrito incremento un 40% (con respecto a los 14 dpi), a los 25 dpi se determinó un incremento en su acumulación de transcrito del 123% (con respecto a los 14 dpi), y a los 28 dpi se registró un descenso en su acumulación de transcrito del 58% (con respecto a los 14 dpi) (Figura 15). En las raíces (desnoduladas) a los mismos tiempos se determinó la acumulación de transcrito de *PvTRE1*, y su acumulación se mantuvo sin cambios y a niveles por debajo la acumulación de transcrito determinada en los nódulos (Figura 15).

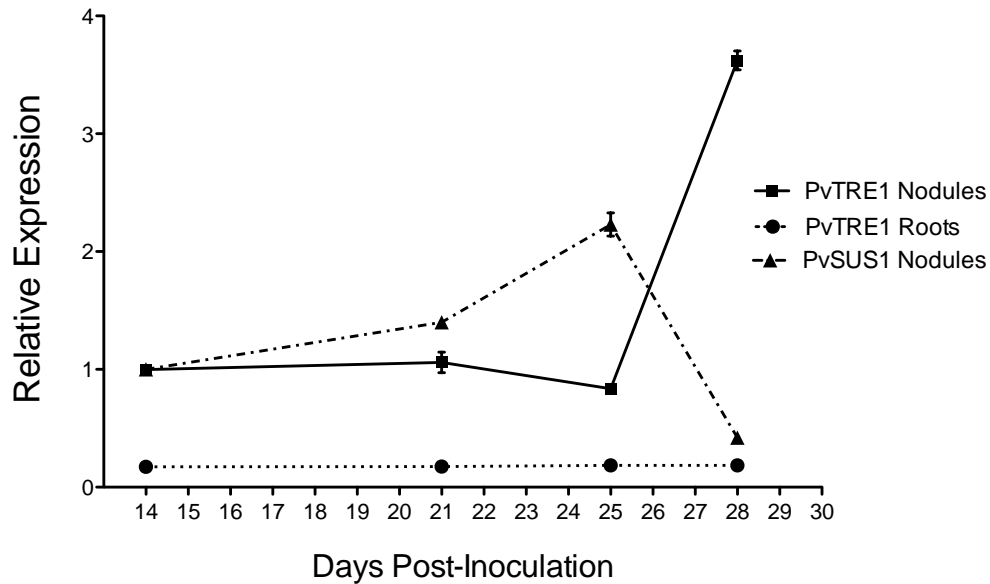


Figura 15. Perfil de expresión de *PvTRE1*, durante el desarrollo del nódulo. a) Determinación del perfil de expresión de *PvTRE1* en nódulos de 14 dpi, 21 dpi, 25 dpi, y 28 dpi, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR), usando el gen de referencia el *factor de elongación eucariota 1 alfa* (*PvEF1 α*). Los resultados corresponden a seis experimentos independientes ($n=6$).

Además, se analizaron los niveles de acumulación de transcrito de *PvTRE1* en distintos órganos de *P. vulgaris* (nódulos, raíces, hojas, vainas y semillas). En las raíces los niveles de acumulación de transcrito de *PvTRE1* con respecto al que se determinó en los nódulos es 5 veces inferior (Figura 16). En hojas y vainas la acumulación de transcrito de *PvTRE1* fue del 80% con respecto al determinado en nódulos (Figura 16). En semillas la acumulación de transcrito de *PvTRE1* fue del 95% con respecto al determinado en nódulos (Figura 16).

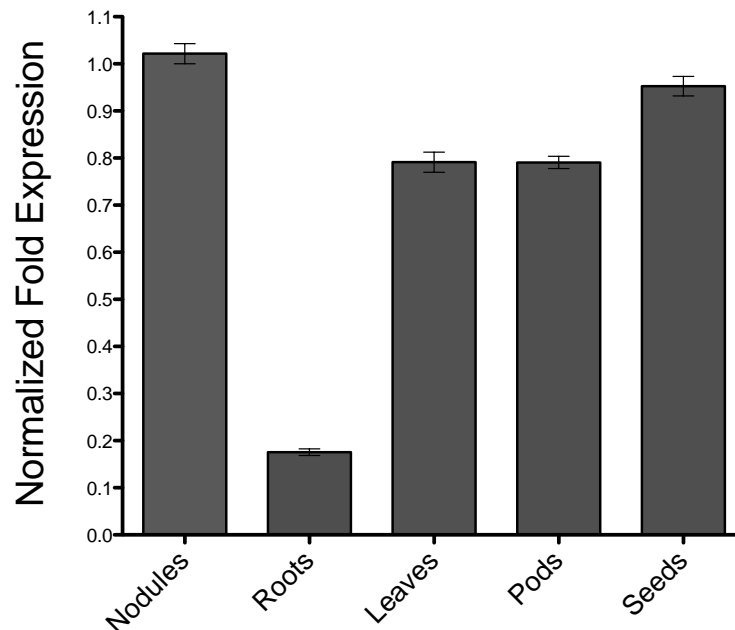


Figura 16. Determinación de la acumulación de transcrito de *PvTRE1* en distintos órganos de *P. vulgaris* (nódulos, raíces, hojas, vainas y semillas) por medio de qRT-PCR, usando el gen de referencia *PvEF1a*. Los resultados corresponden a seis experimentos independientes ($n=6$).

Se cuantificó el perfil del contenido de carbohidratos solubles en cada punto a lo largo del desarrollo del nódulo (14 dpi, 21 dpi, 25 dpi y 28 dpi) por HPLC. El contenido de sacarosa presentó dos picos de concentración máxima a los 21 dpi y a los 28 dpi, y los picos de concentración mínima a los 14 dpi y a los 28 dpi (Figura 17). El contenido de trehalosa presentó su pico máximo de concentración a los 25 dpi, a los 14 dpi y a los 28 dpi se registraron los niveles de concentración mínimos (Figura 17). El contenido de maltosa se pudo cuantificar sólo hasta los 25 dpi, con una concentración constante, y a los 28 dpi la concentración de maltosa disminuyó a niveles por debajo del límite de detección (Figura 17). El contenido de glucosa se pudo cuantificar a los 21 dpi y 25 dpi; y su concentración máxima se determinó a los 25 dpi (Figura 17). El contenido de fructosa sólo se cuantificó a los 21 dpi (Figura 17).

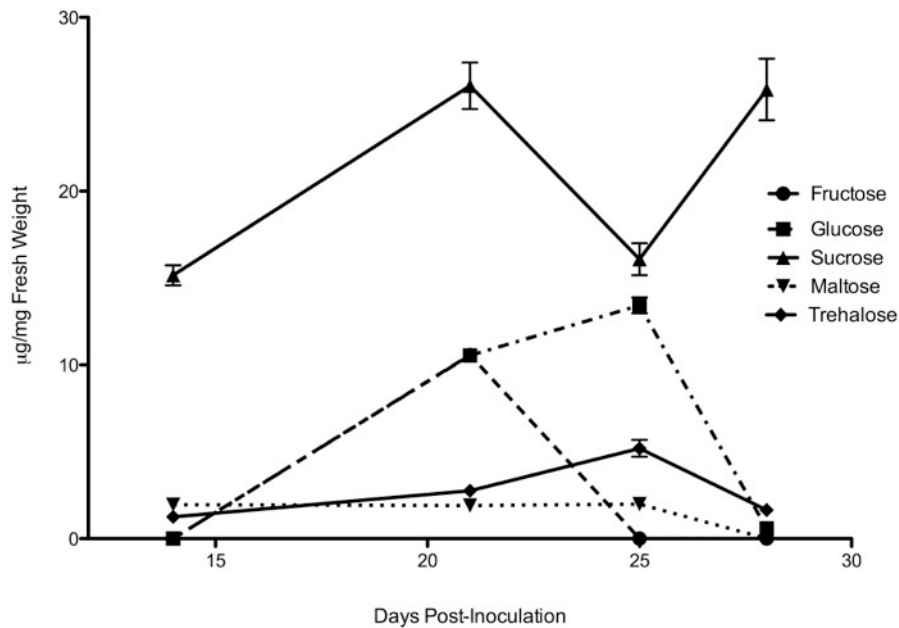


Figura 17. Determinación del perfil de carbohidratos solubles en nódulos de 14 dpi, 21 dpi, 25 dpi, y 28 dpi. La cuantificación de los carbohidratos solubles es el promedio de 3 experimentos independientes ($n=3$).

Además, también se observó una relación directa entre la acumulación de transcrito de *PvSUS1* y la concentración de trehalosa a lo largo del desarrollo del nódulo (14 dpi, 21 dpi, 25 dpi, y 28 dpi) (Figura 18).

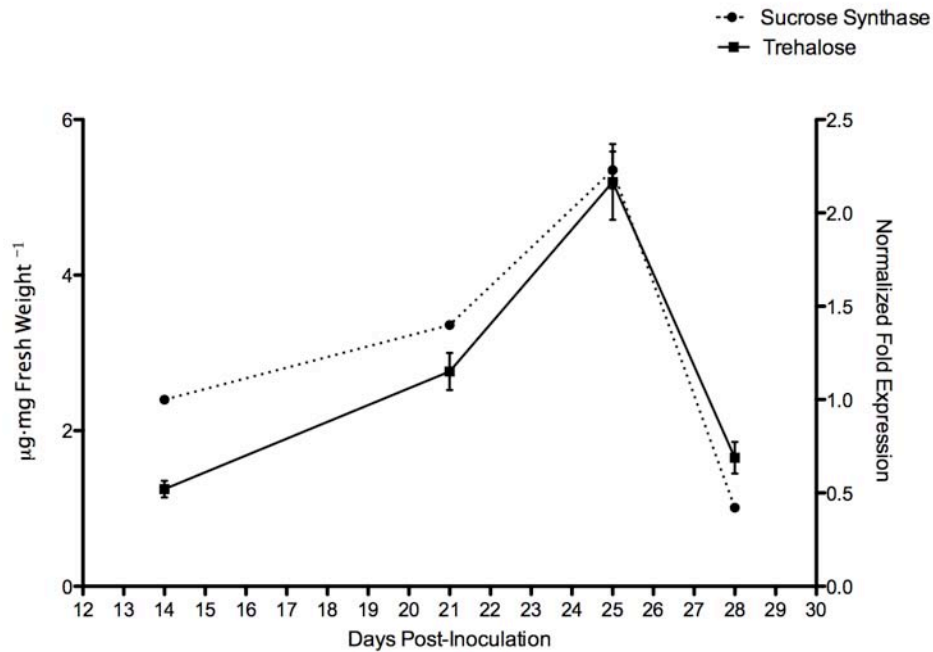


Figura 18. Relación entre la acumulación de transcrito de la *sacarosa sintasa 1* (*PvSUS1*) y el contenido de trehalosa durante el desarrollo del nódulo (14 dpi, 21 dpi, 25 dpi, y 28 dpi). Los resultados de acumulación de transcrito corresponden a seis experimentos independientes ($n=6$), y los resultados de cuantificación de trehalosa corresponden a 3 experimentos independientes ($n=3$).

3.4 SILENCIAMIENTO DE *PvTRE1* Y EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DE CARBONO, CRECIMIENTO Y DESARROLLO, Y AUTOFAGIA

La acumulación de transcrito de *PvTRE1* se determinó en nódulos transgénicos de 21 dpi con la construcción pTdT-*PvTRE1*-RNAi (*PvTRE1*-RNAi) por medio de qRT-PCR. La disminución en la acumulación de transcrito de *PvTRE1* que se determinó en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue de aproximadamente un 82% (Figura 19).

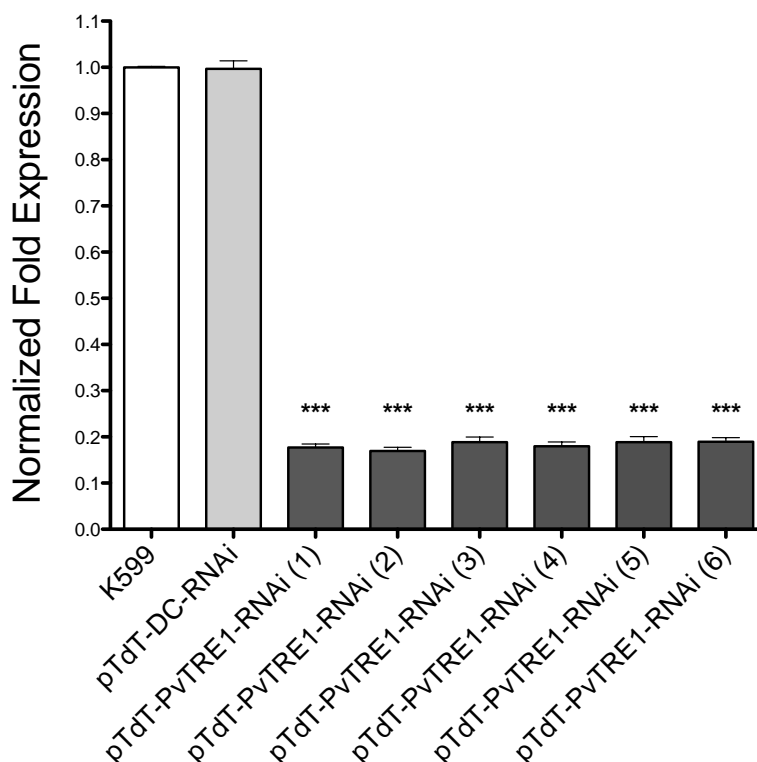


Figura 19. Determinación de la disminución en la acumulación de transcrito de *PvTRE1* en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Los resultados de acumulación de transcrito corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcrito de *PvTRE1* en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($*** < P=0.001$).

Además, se analizó la acumulación de transcrito de nódulos transgénicos con la construcción pTdT-GUS-RNAi y generados sólo con *A. rhizogenes* K599 (K599) de *PvTRE1* y de *GUS* para determinar que las construcciones basadas en pTdT-DC-RNAi no tengan efectos *per se* sobre los niveles de acumulación de transcrito del gen blanco analizado y corroborar que el RNAi de *GUS* no afecte al gen blanco. Los niveles de acumulación de transcrito de *PvTRE1* en ambos casos no fueron alterados (Figura 20). Esto indica que los niveles de transcrito del gen blanco no fueron alterados por la construcción basada en pTdT-DC-RNAi, ni que el RNAi de *GUS* tenga efecto alguno.

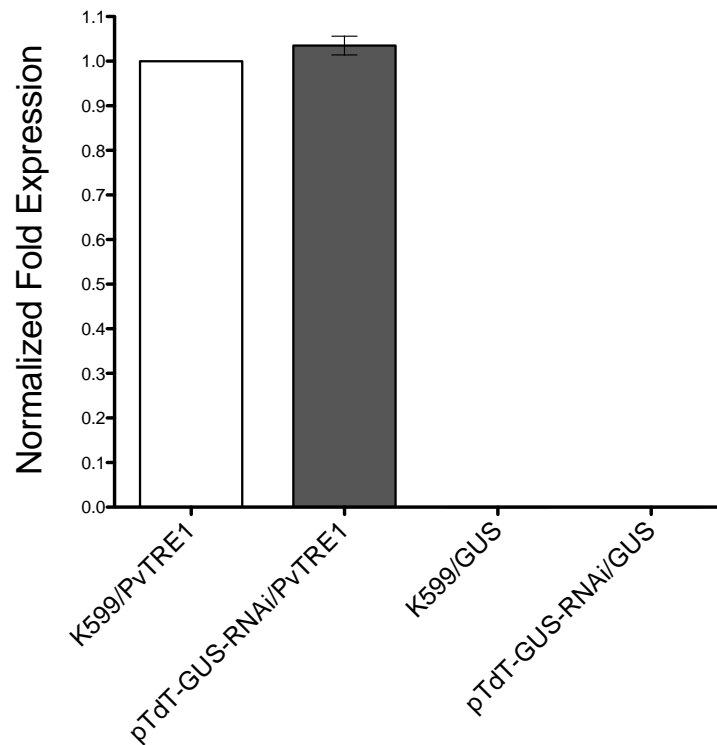


Figura 20. Determinación de niveles de acumulación de transcrito de *PvTRE1* y *GUS* en nódulos control (K599, pTdt-GUS-RNAi). Los resultados de acumulación de transcrito corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$).

Al disminuir los niveles de acumulación de transcrito de *PvTRE1* (82%) en nódulos de *P. vulgaris* y para evaluar el efecto de esta disminución sobre genes del metabolismo del carbono, desarrollo y crecimiento, y autofagia se realizaron análisis de acumulación de transcrito mediante qRT-PCR. Los genes del metabolismo del carbono analizados fueron la sacarosa sintasa 1 (*PvSUS1*) y la hexocinasa 1 (*PvHKK1*); los genes analizados para desarrollo y crecimiento fueron TOR (*PvTOR*) y SnRK1 (*PvSnRK1*), y los genes analizados para autofagia fueron la *proteína relacionada a la autofagia 3* (*PvATG3*) y *Beclina* (*PvBeclin*). Los genes analizados del metabolismo del carbono (*PvSUS1*, *PvHKK1*), desarrollo y crecimiento (*PvTOR*, *PvSnRK1*), y autofagia (*PvATG3*, *PvBeclin*) mostraron incremento en la acumulación de transcrito, exceptuando al gen de autofagia *PvBeclin* (el cual no presentó cambios en la acumulación de transcrito) (Figura 21). El incremento en la acumulación de transcrito de *PvSUS1* fue de 203%, de *PvHKK1* fue de 134%, de *PvTOR* fue de 43%, de *PvSnRK1* fue de 81%, y de *PvATG3* fue de 26% (Figura 21).

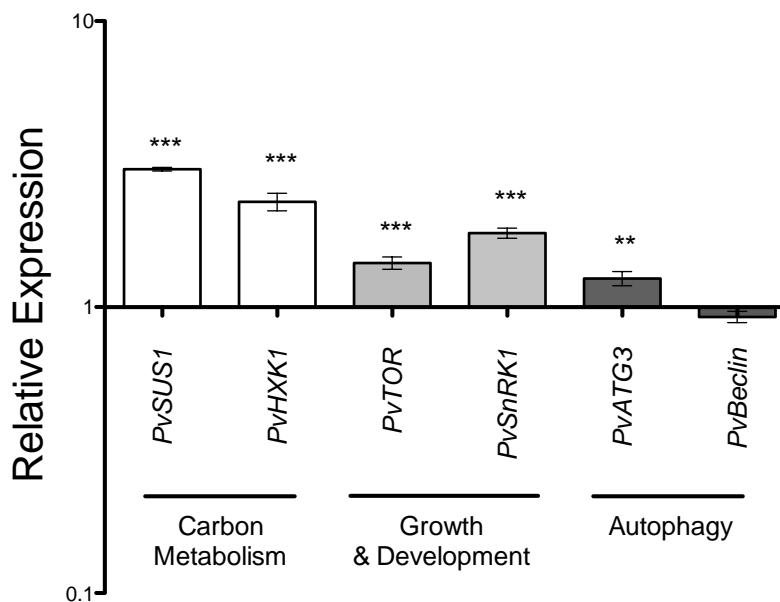


Figura 21. Análisis del cambio de acumulación de transcritos de genes del metabolismo del carbono, desarrollo y crecimiento, y autofagia en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. La determinación de acumulación de transcrito de *PvSUS1*, *PvHXK1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*, *PvATG3*, y *PvBeclin* se muestran en escala logarítmica (Log₁₀). Los resultados de acumulación de transcrito corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcrito de *PvSUS1*, *PvHXK1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*, *PvATG3*, y *PvBeclin* en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas (** $<P=0.01$, *** $<P=0.001$).

3.5 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA Y ULTRA-ESTRUCTURA DE LOS NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE *PvTRE1*-RNAi

Los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se analizaron mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el fin de determinar posibles alteraciones estructurales del órgano y de los bacteriodes, respectivamente; que pudieran ser derivados por la disminución en la acumulación de transcrito de *PvTRE1* y del cambio en la expresión de genes del metabolismo del carbono (*PvSUS1*, *PvHXK1*), desarrollo y crecimiento (*PvTOR*, *PvSnRK1*), y autofagia (*PvATG3*, *PvBeclin*). Los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi al analizarse mediante microscopía óptica no presentaron alteraciones estructurales evidentes al compararlos con los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 22a-c). Aunque, al analizar la ultra-estructura de las células infectadas de los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se observó un incremento en el número de bacteriodes al comparar con las células infectadas de los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 22d-f), el cual se corroboró mediante el conteo de bacteriodes por campo visual ($577.5 \mu\text{m}^2$) por célula infectada de los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi y el conteo de bacteriodes por campo visual ($577.5 \mu\text{m}^2$) por célula infectada de los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 24). Además, en los bacteriodes de las células infectadas de los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se observó una estructura que los rodea, a la cual se le denominó “límite electro-denso” (edb) (Figura 22i), la cual esta ausente en los bacteriodes de las células infectadas de los nódulos control (Figura 22g-h); en la Figura 23 se muestran bacteriodes de nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi de distintas plantas compuestas.

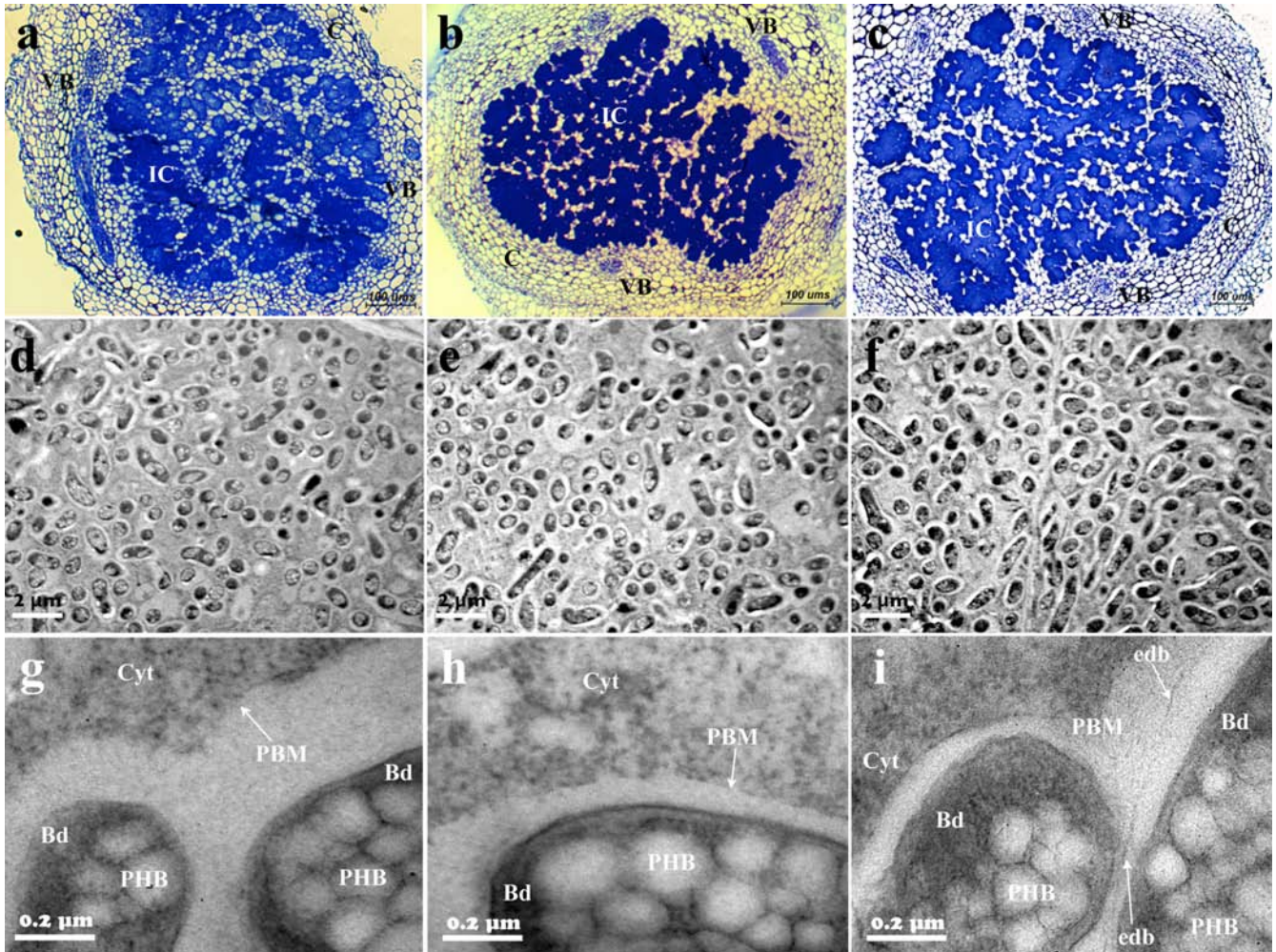


Figura 22. Estructura de los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. (a-c) Microscopía óptica de un nódulo de K599 (a), de un nódulo de pTdT-DC-RNAi (b), y de un nódulo de *PvTRE1*-RNAi (c). (d-i) Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los bacteroides dentro de los nódulos de K599 (d y g), dentro de los nódulos de pTdT-DC-RNAi (e y h), y dentro de los nódulos de *PvTRE1*-RNAi (f y i). Las imágenes mostradas son representativas. VB, haz vascular; C, cortex; IC, células infectadas; Bd, bacteroides; Cyt, citoplasma; PHB, poli-β-hidroxi-butaratos; edb, límite electro-denso; PBM, membrana peribacteroidal.

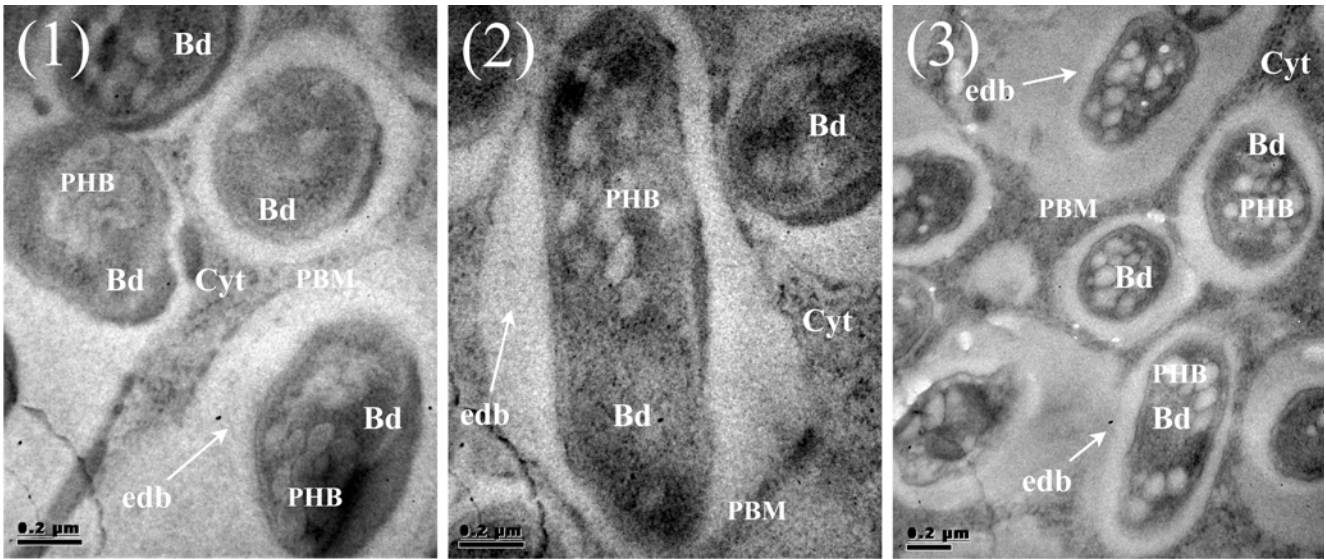


Figura 23. Micrografías de TEM de los bacteroides de nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi de distintas plantas compuestas. Se muestran resultados representativos, y el número entre paréntesis indica tres de las seis plantas compuestas de *P. vulgaris* que se analizaron de manera independiente.

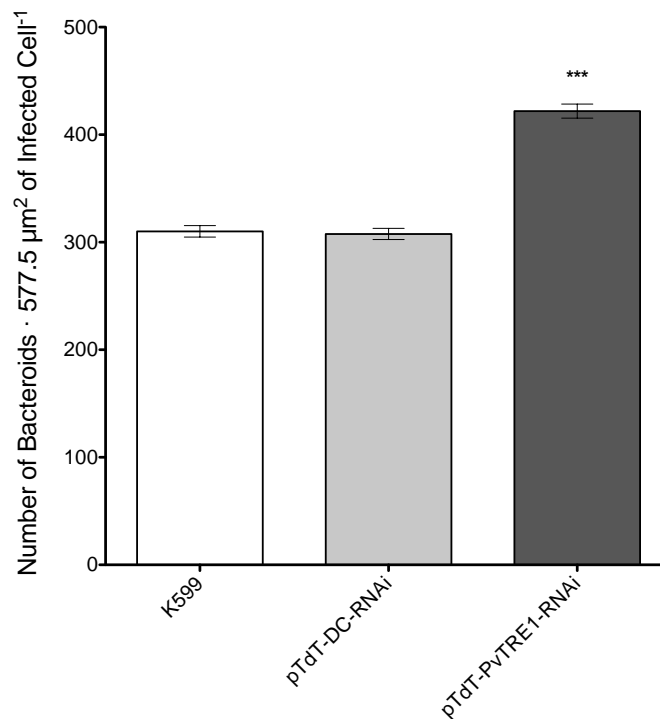


Figura 24. Densidad de bacteroides por campo visual ($577.5 \mu\text{m}^2$) por célula infectada. Los resultados de la densidad de bacteroides por campo visual ($577.5 \mu\text{m}^2$) por célula infectada de los nódulos corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de la densidad de bacteroides por campo visual ($577.5 \mu\text{m}^2$) por célula infectada de los nódulos fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas (***) ($P=0.001$).

3.6 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE *PvTRE1*-RNAi

Al determinar la reducción en la acumulación de transcrito de *PvTRE1* en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi, se evaluó la concentración de carbohidratos solubles en estos (fructosa, glucosa, sacarosa, y trehalosa) a los 21 dpi. El contenido de trehalosa en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi incrementó aproximadamente un 78% en comparación con los nódulos control (K599, pTdt-DC-RNAi) (Figura 25). El contenido de sacarosa en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se redujo aproximadamente un 20% en comparación con los nódulos transgénicos control (K599, pTdt-DC-RNAi) (Figura 25). El contenido de fructosa y glucosa en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se mantuvo sin cambios con respecto al contenido de ambos carbohidratos solubles en los nódulos control (K599, pTdt-DC-RNAi) (Figura 25).

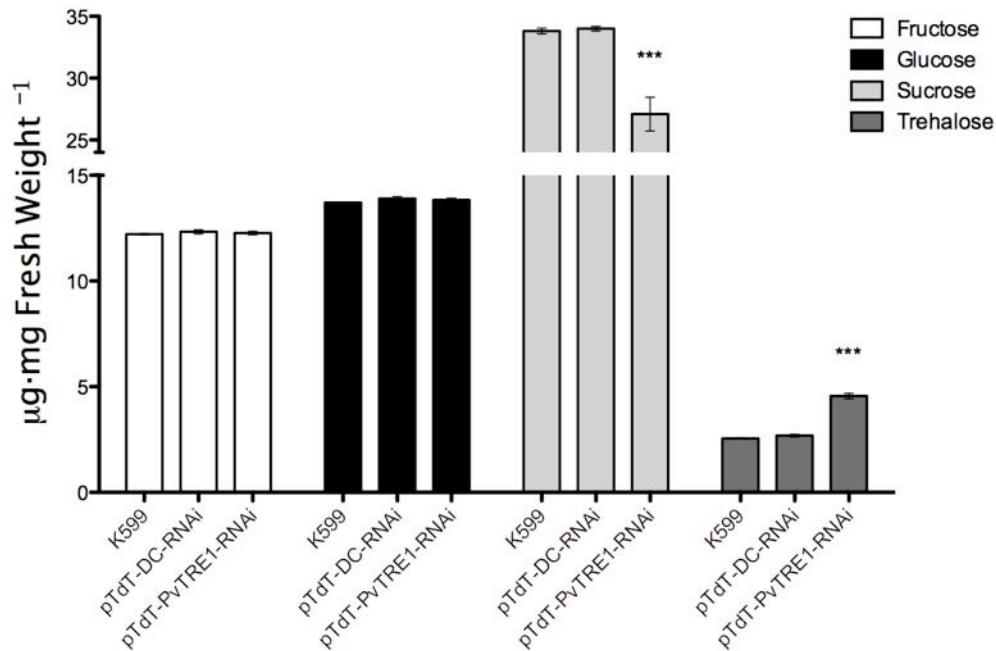


Figura 25. Determinación del incremento del contenido de trehalosa en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Análisis del contenido de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa, sacarosa, y trehalosa), mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Los resultados de cuantificación de carbohidratos solubles corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del contenido de cada carbohidrato soluble fue mediante la aplicación de ANOVA seguido de una prueba de Dunnett ($***<P=0.001$).

3.7 ANÁLISIS DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LOS NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE *PvTRE1*-RNAi

En las micrografías electrónicas se determinó el incremento en el número de bacteroides por campo visual ($577.5 \mu\text{m}^2$), y se corroboró mediante su conteo en los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi (Figura 22f, y 24). Por ende, se evaluó la viabilidad de los mismos re-aislándolos de los nódulos, para así determinar si hay relación entre el incremento de los bacteroides dentro de las células infectadas y la viabilidad de los mismos. La viabilidad de los bacteroides re-aislados se determinó mediante unidades formadoras de colonia (CFU). Los bacteroides re-aislados de los nódulos transgénicos de

PvTRE1-RNAi fueron capaces de formar 9 veces más CFUs por nódulo (casi un orden de magnitud mayor), que los bacteroides re-aislados de los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 26).

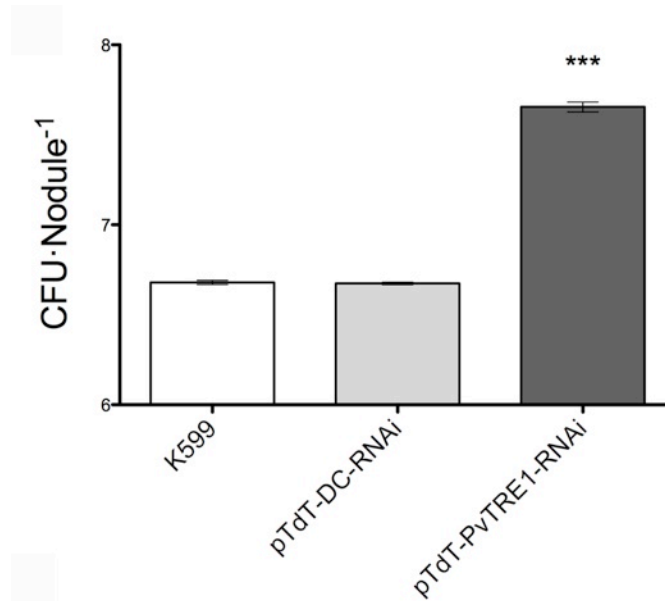


Figura 26. Re-aislamiento de *Rhizobium* de los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi y determinación de las unidades formadoras de colonia (CFU). Los resultados de las CFUs corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de las CFUs fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($***<P=0.001$).

La fijación de nitrógeno, mediante el ensayo de reducción de acetileno a etileno (Vessey, 1994), se evaluó con el fin de determinar la relación entre la viabilidad de los bacteroides en los nódulos y su capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) a su forma asimilable (NH_3). En los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se registró un incremento del 70% en la fijación de nitrógeno (reducción de acetileno a etileno) comparándolos con la fijación de nitrógeno registrada en los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 27).

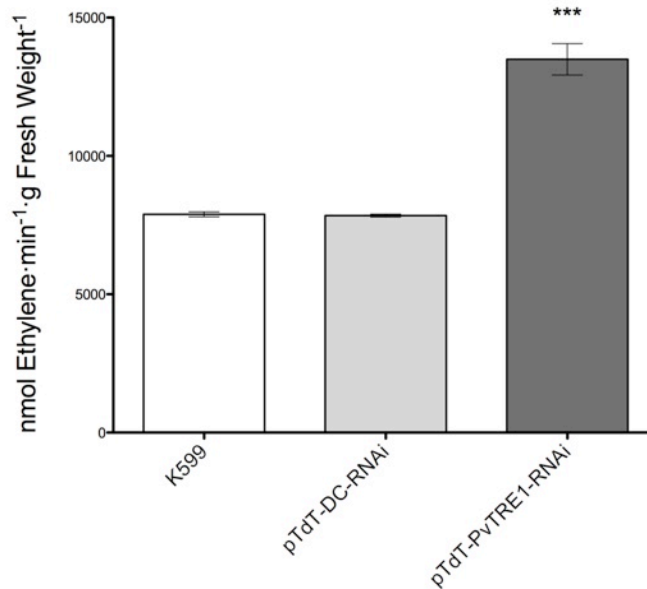


Figura 27. Determinación de la fijación de nitrógeno en nódulos de *PvTRE1*-RNAi mediante el ensayo de reducción de acetileno. Los resultados de la fijación de nitrógeno en los nódulos corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de la fijación de nitrógeno en los nódulos fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas (***) ($P<0.001$).

La fijación de nitrógeno está relacionada con la asimilación del nitrógeno (Silvente *et al.*, 2002), entonces se evaluó la acumulación de transcrito de genes relacionados directamente con la asimilación de nitrógeno mediante qRT-PCR. El análisis de la acumulación de transcrito se enfocó en los genes de la *NADH-Glutamato sintasa II* (*PvGOGAT*) y de la *Glutamina sintetasa* (*PvGS*). La acumulación de transcrito de *PvGOGAT* en los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi incrementó aproximadamente 80% con respecto a lo registrado en los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 28). En cambio, la acumulación de transcrito de *PvGS* en los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi no se pudo determinar una diferencia significativa con respecto a la acumulación de transcrito de *PvGS* en los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 30).

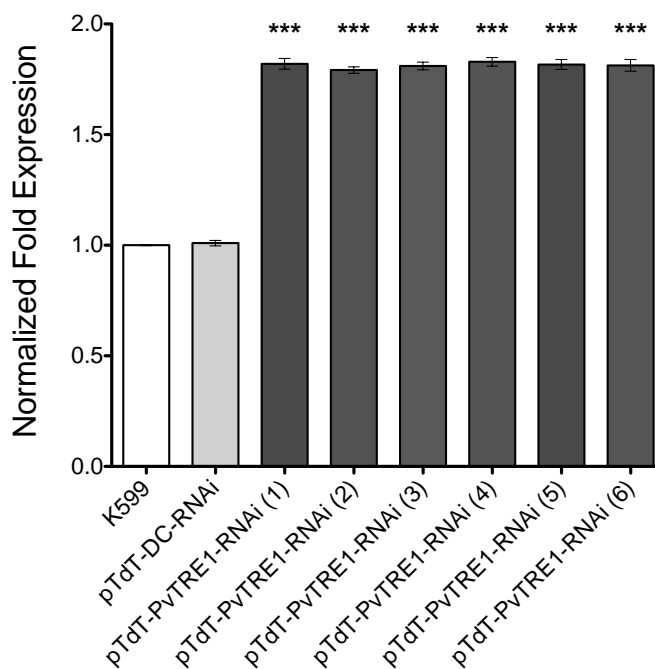


Figura 28. Determinación de la acumulación del transcrito de la *NADH-Glutamato sintasa II* de *P. vulgaris* en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi (*PvGOGAT*). Los resultados de acumulación de transcrito de *PvGOGAT* corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcrito de *PvGOGAT* en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas ($*** < P=0.001$).

Dentro de los parámetros fisiológicos evaluados, la biomasa de los nódulos indica la movilización del carbono hacia la síntesis de macromoléculas que repercuten directamente sobre este parámetro fisiológico evaluado. Los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi tuvieron un incremento de aproximadamente 3 veces más biomasa con respecto a la biomasa evaluada en los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 29).

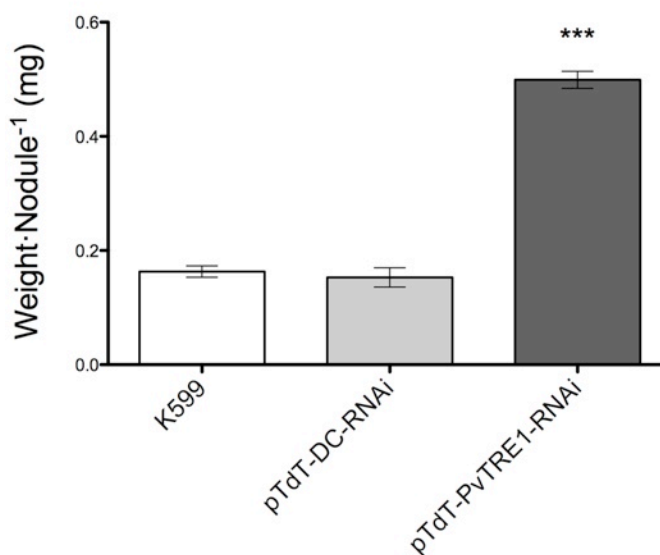


Figura 29. Biomasa de los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Los resultados de la biomasa de los nódulos corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de la biomasa de los nódulos fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($***<P=0.001$).

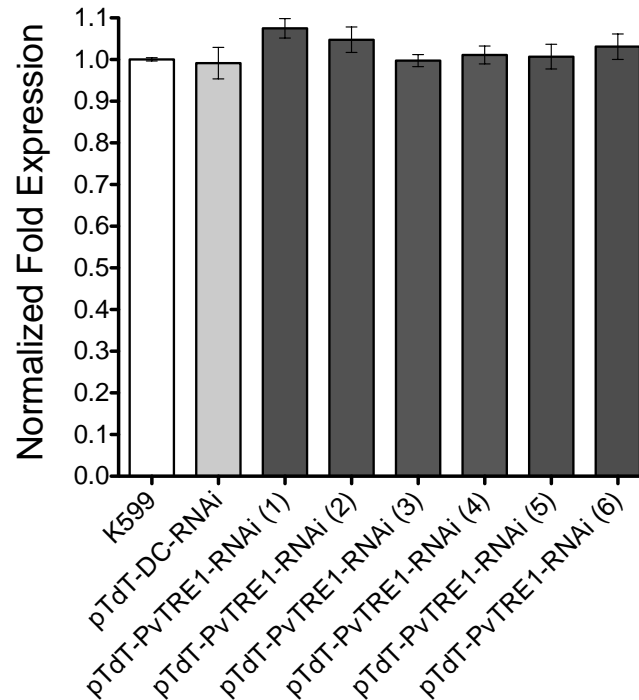


Figura 30. Determinación de la acumulación de transcrito de la *Glutamina sintetasa* de *P. vulgaris* en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi (*PvGS*). Los resultados de acumulación de transcrito de *PvGS* corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcrito de *PvGS* en nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas.

Además, se evaluó la producción de nódulos en las raíces transgénicas de *PvTRE1*-RNAi de *P. vulgaris*. La producción de nódulos en las raíces transgénicas de *PvTRE1*-RNAi no registró alteración significativa con respecto a la producción de nódulos en las raíces control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 31).

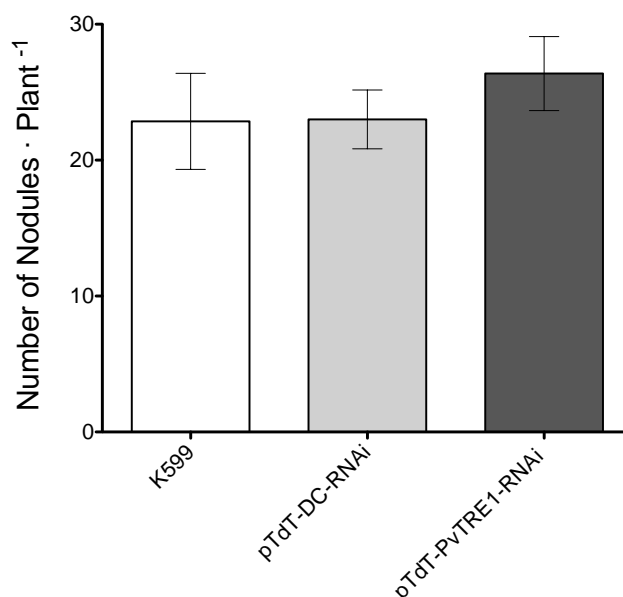


Figura 31. Número de nódulos producidos en raíces transgénicas de *PvTRE1*-RNAi de *P. vulgaris*. Los resultados del número de nódulos producidos en raíces transgénicas de *PvTRE1*-RNAi corresponden a tres plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas.

3.8 ANÁLISIS DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LAS HOJAS DE LAS PLANTAS COMPUESTAS CON NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE *PvTRE1*-RNAi

Las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* se sometieron al análisis de parámetros fisiológicos para determinar el impacto de la disminución en la acumulación de transcrito de *PvTRE1* y el incremento del contenido de trehalosa en los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Los parámetros fisiológicos evaluados en las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* fueron los siguientes: contenido de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa, sacarosa, y trehalosa), análisis de acumulación de transcrito de *PvTRE1*, el contenido relativo de agua (RWC), biomasa o peso seco, y área foliar.

El perfil del contenido de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa, sacarosa, y trehalosa), en la hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se evaluó mediante la cuantificación de los mismos por medio del uso de HPLC. En las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se determinó el incremento de aproximadamente el 27% del contenido de trehalosa en comparación con hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos control (K599, pTdt-DC-RNAi) (Figura 32). En cambio, el contenido de fructosa, glucosa, y sacarosa en las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi no cambió significativamente con respecto a las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos control (K599, pTdt-DC-RNAi) (Figura 32).

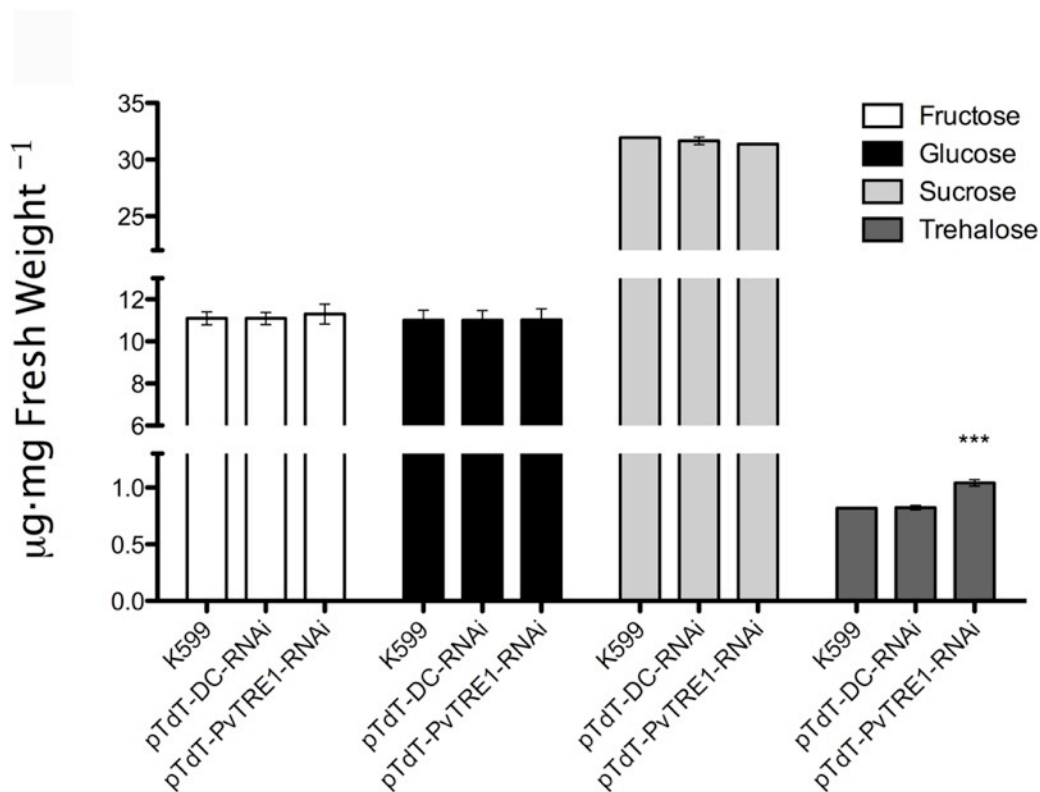


Figura 32. Análisis del contenido de carbohidratos solubles hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Análisis del contenido de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa, sacarosa, y trehalosa), mediante HPLC. Los resultados de cuantificación de carbohidratos solubles corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del contenido de cada carbohidrato soluble fue mediante la aplicación de ANOVA seguido de una prueba de Dunnett ($***<P=0.001$).

Al determinar el incremento del contenido de trehalosa en las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris*, se decidió evaluar la acumulación de transcrito de *PvTRE1* en estos órganos mediante qRT-PCR. En las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi no se determinó alteración o cambio significativo en la acumulación de transcrito de *PvTRE1* en comparación con hojas de plantas compuestas con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 33).

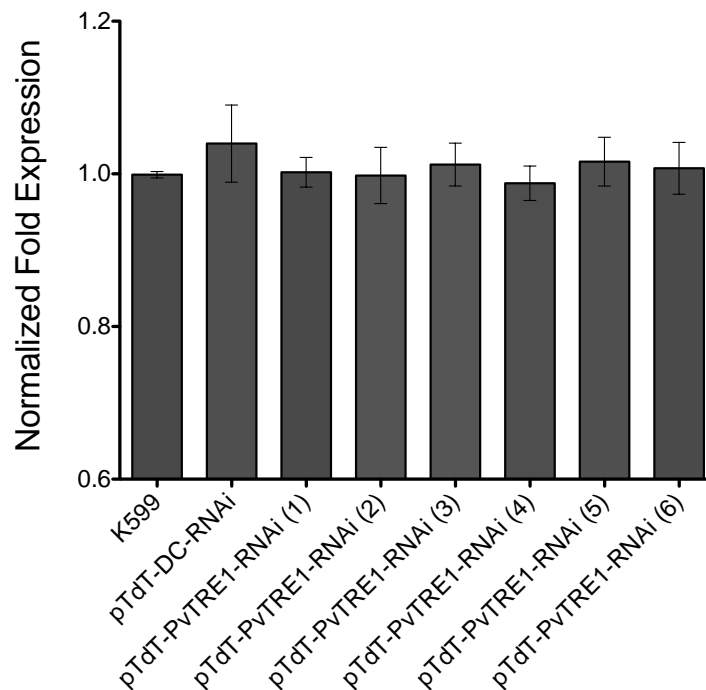


Figura 33. Análisis de acumulación de transcrito de *PvTRE1* en hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Los resultados de acumulación de transcrito de *PvTRE1* corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcrito de *PvTRE1* en hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas.

La acumulación de trehalosa en los hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi no dio lugar al incremento en la acumulación de transcrito de *PvTRE1*. Sin embargo, el incremento del contenido de trehalosa podría provocar el aumento en el contenido relativo de agua de este órgano. Por ende, se evaluó el contenido relativo de agua (RWC) en estos órganos. En las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se registró un incremento significativo del RWC de aproximadamente el 3% con respecto a las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 34).

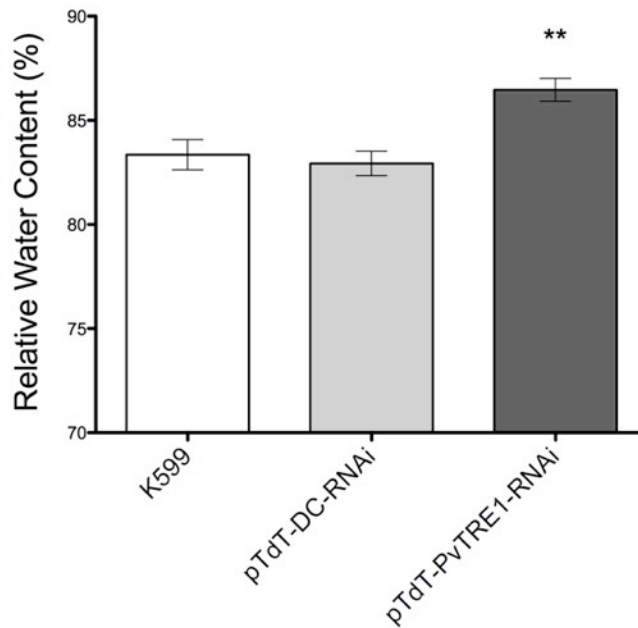


Figura 34. Contenido relativo de agua (RWC) de hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Los resultados de RWC en las hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de RWC en hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas (** $<P=0.01$).

Otro de los parámetros a evaluar fue la biomasa o peso seco de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi y nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi). El peso seco de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se mantuvo sin cambio significativo con respecto a las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 35).

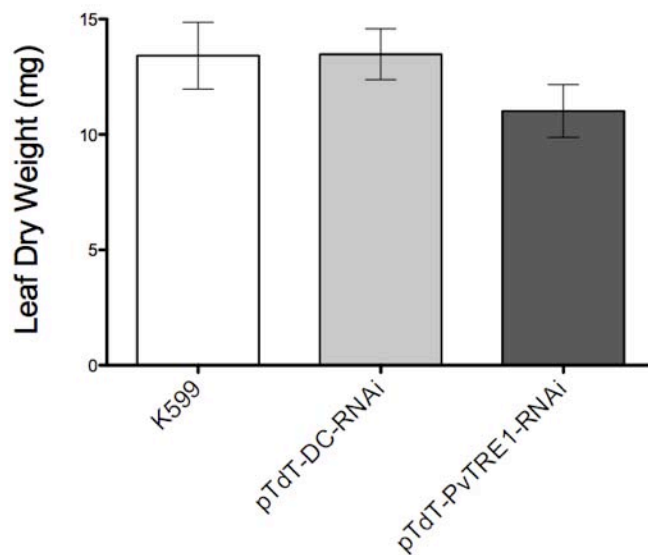


Figura 35. Peso seco o biomasa de las hojas de las plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Los resultados del peso seco en las hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del peso seco en hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas.

Por último, se evaluó el área foliar de las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi y con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi). El área foliar de las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi no cambió significativamente con respecto al área foliar de las hojas de plantas compuestas de frijol con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 36).

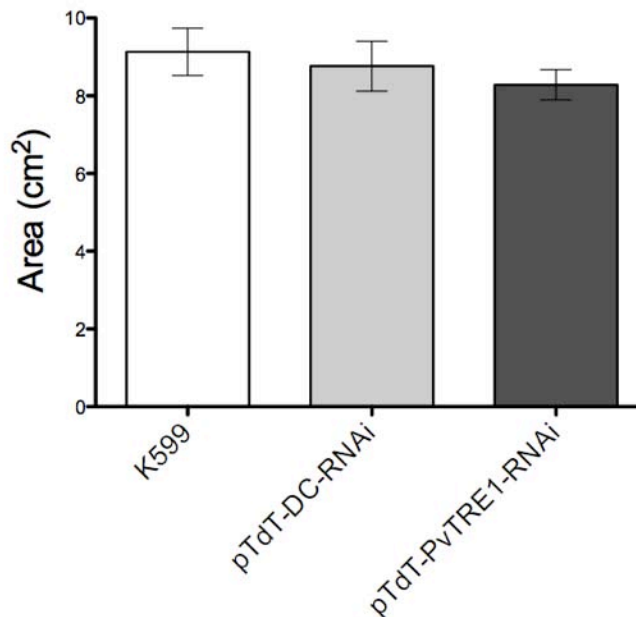


Figura 36. Área foliar de hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi. Los resultados del área foliar en las hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del área foliar en las hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas.

4. *PvTPS6c2* (*PvTPS6c2*-RNAi)

En *P. vulgaris* se ha reportado la acumulación de transcritos en nódulos (ESTs CV542030 y CV535738) (Ramírez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007). El EST CV542030 corresponde a la región 3'-codificante y a la 3'-no-traducida de *PvTPS6class2* (*PvTPS6c2*); este gen es integrante de la familia de TPSs clase II de *P. vulgaris* (Tabla 4).

La secuencia completa de *PvTPS6c2* se analizó por medio de “BlastX” (sitio web de NCBI) y “Blast” del borrador del genoma de *P. vulgaris*, con el uso de Phytozome y Mazorka (Phytozome v8.0, <http://www.phytozome.net>; Mazorka, <http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/blast/>). Además, se analizaron 2000 pb de la secuencia río arriba del codón de inicio de *PvTPS6c2*, a lo que se denominó región

promotora, con PlantPan (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/gene_group/index.php) para determinar los sitios o cajas de unión de factores transcripcionales para activar la transcripción génica durante la nodulación (NODCON1/2GM). En la región reguladora de la expresión génica de *PvTPS6c2* se determinó la presencia de 59 secuencias reguladoras de la expresión génica diferentes, destacando ocho secuencias, o motivos, reguladoras de activación de la expresión génica durante la nodulación (NODCON1GM/OSE1ROOTNODULE y NODCON2GM/OSE2ROOTNODULE), tres más que las encontradas en la secuencia de la región promotora de la *leghemoglobina A* de *P. vulgaris* (Figura 37, Tabla 6).

Tabla 6. Listado de secuencias de unión de factores de transcripción en las regiones promotoras de *PvTPS6c2*.

pPvTPS6c2 Secuencias Reguladoras	Frecuencia
AGL3	1
AG	2
Athb-1	3
ATHB-5	6
ATHB-9	1
CDC5	1
PIF3	2
ABRE-like	2
ABRELATERD1	3
ABRERATCAL	2
ACGTABREMOTIFA20SEM	3
ACGTLATERD1	5
ANAERO2CONSENSUS	2
AP1	2
ARR10	4
ARR1AT	11
ASF1MOTIFCAMV	3
AUXRETGA2GMGH3	1
Agamous	1
BOXCPSAS1	1
CAATBOX1	7
CACGTGMOTIF	1
CCAATBOX	3
Core	12
GADOWNAT	1
GATABOX	6
GBF5	3
GT1CONSENSUS	3
GT1CORE	1
GT1GMSCAM4	1
HEXAT	1
HMG-1	2

pPvTPS6c2 Secuencias Reguladoras	Frecuencia
HMG-IY	1
IBOX	1
MYB1LEPR	1
MYB2CONSENSUSAT	2
MYBCOREATCYCB1	3
MYBCORE	4
MYCONSENSUSAT	11
NODCON1GM	2
NODCON2GM	6
OSE1ROOTNODULE	2
OSE2ROOTNODULE	6
PREATPRODH	3
RAV1-B	1
RAV1BAT	1
SEF4MOTIFGM7S	5
SITEIIATCYTC	1
SORLIP1AT	2
SORLIP2AT	1
SREATMSD	1
SURECOREATSULTR11	2
SV40COREENHAN	1
TATABOX5	2
TGA1	1
TGBOXATPIN2	1
UPRMOTIFIAT	1
UPRMOTIFIAT	1
WBOXATNPR1	2

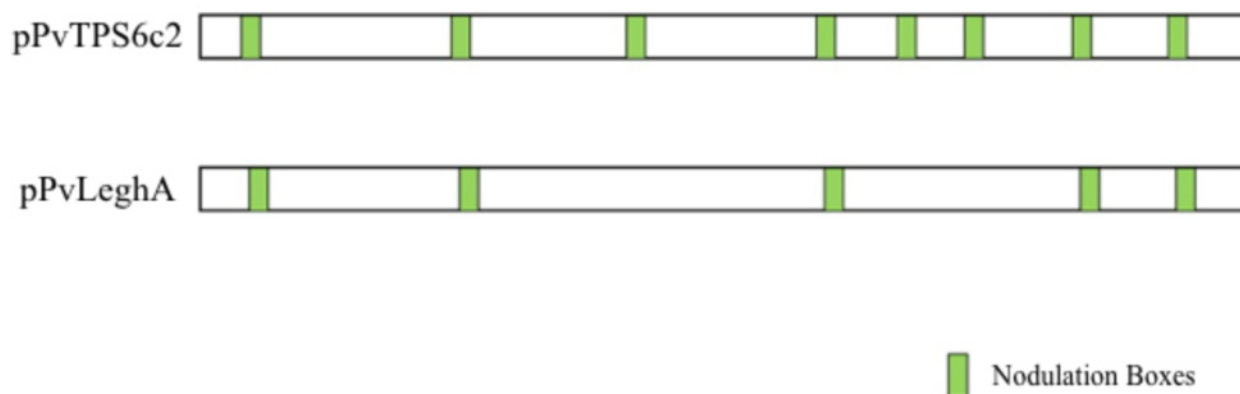


Figura 37. Presencia de secuencias o cajas reguladoras de activación de la expresión génica durante la nodulación presentes en *PvTPS6c2* y *PvLeghA*. Las cajas, o motivos, presentes están resaltados en verde.

4.1 ESTRUCTURA GÉNICA, TRIDIMENSIONAL Y DISTRIBUCIÓN DE PvTPS6c2 (DOMINIO SINTASA Y DOMINIO FOSFATASA)

PvTPS6c2 es el único integrante de las TPSs (clase I y II) con reportes de expresión (Ramírez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007). Este gen posee dos exones y un intrón, la enzima para la que codifica posee los dominios sintasa (TPS) y fosfatasa (TPP), con un sitio de fosforilación en la región amino terminal (para interactuar con las proteínas 14-3-3). A partir de la secuencia deducida de amino ácidos, y de la localización del dominio sintasa (TPS) y del dominio fosfatasa (TPP), se pudo deducir la estructura tridimensional tanto para el dominio sintasa y el dominio fosfatasa (Figura 38) (DeLano, 2002; Gibson *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2006). El valor obtenido de “RMSD” al comparar la estructura tridimensional del dominio sintasa (TPS) de *PvTPS6c2* de *P. vulgaris* con la estructura cristalográfica de EcOtsA de *E. coli* fue de 0.084 Å, sugiriendo alto grado de conservación de la estructura tridimensional de este dominio con la estructura cristalizada de la proteína homóloga al dominio, y probablemente de función (Figura 38). El valor de “RMSD” al comparar la estructura tridimensional del dominio fosfatasa (TPP) de *PvTPS6c2* de *P. vulgaris* con la estructura cristalográfica de TaTPP de *T. acidophilum* fue de 0.084 Å, sugiriendo alto grado de conservación de la estructura tridimensional de este dominio con la estructura cristalizada de la proteína homóloga al dominio, y probablemente de función (Figura 38). Por último, *PvTPS6c2* presenta homología y se agrupa en el mismo clado con AtTPS6 (Figura 41), presentando identidad del 77.1% y similitud del 86.1% con esta última. AtTPS6 es una TPS clase II (Figura 39), involucrada en regular la estructura del citoesqueleto, y en la producción de trehalosa (Chary *et al.*, 2008).

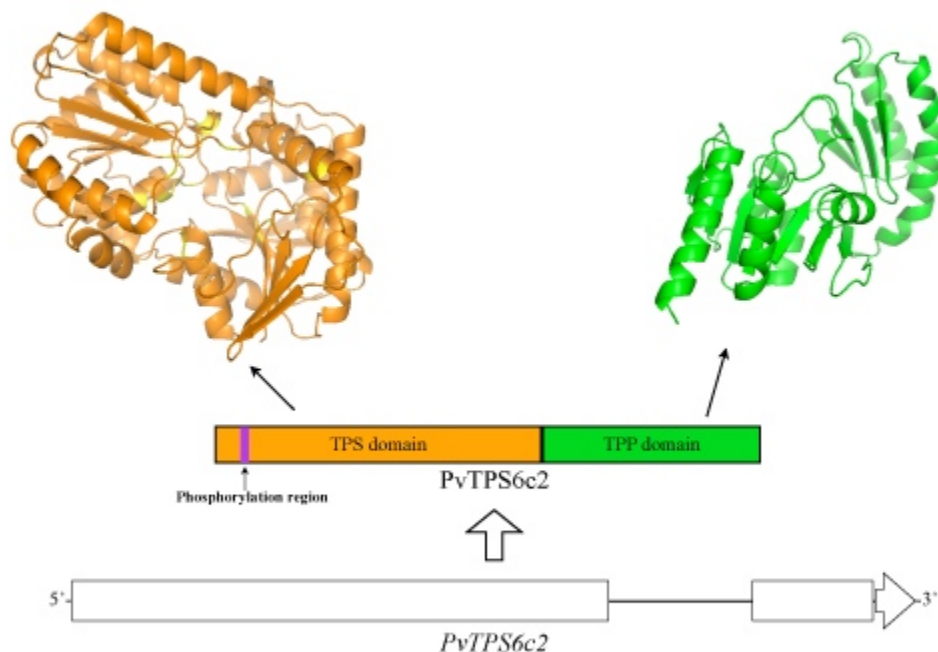


Figura 38. Estructura del gen, organización de los dominios, y estructura tridimensional de *PvTPS6c2*. La estructura del gen de *PvTPS6c2* consiste de dos exones y un intrón. *PvTPS6c2* posee los dominios sintasa y fosfatasa, resaltando en morado el sitio de fosforilación para interactuar con proteínas 14-3-3. Estructura tridimensional de los dominios sintasa y fosfatasa de *PvTPS6c2*; resaltando los detalles del sitio catalítico del dominio sintasa de *PvTPS6c2*. Las estructuras tridimensionales de los dominios sintasa y fosfatasa de *PvTPS6c2*, fueron analizadas con PyMol 1.3 (DeLano, 2002), deducidas a partir

corresponden a las cajas de actividad fosfatasa del dominio fosfatasa (Leyman *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2006).

Con el uso de la base de datos de Phytozome v8.0 se analizaron las secuencias y la estructura génica de todos los integrantes de la familia de las TPSs clase II (*PvTPS1c2-7c2*); se determinó que *PvTPS3c2*, *PvTPS5c2* y *PvTPS6c2* poseen 2 exones y 1 intrón; y *PvTPS1c2*, *PvTPS2c2*, *PvTPS4c2* y *PvTPS7c2* poseen 3 exones y 2 intrones (Figura 40).

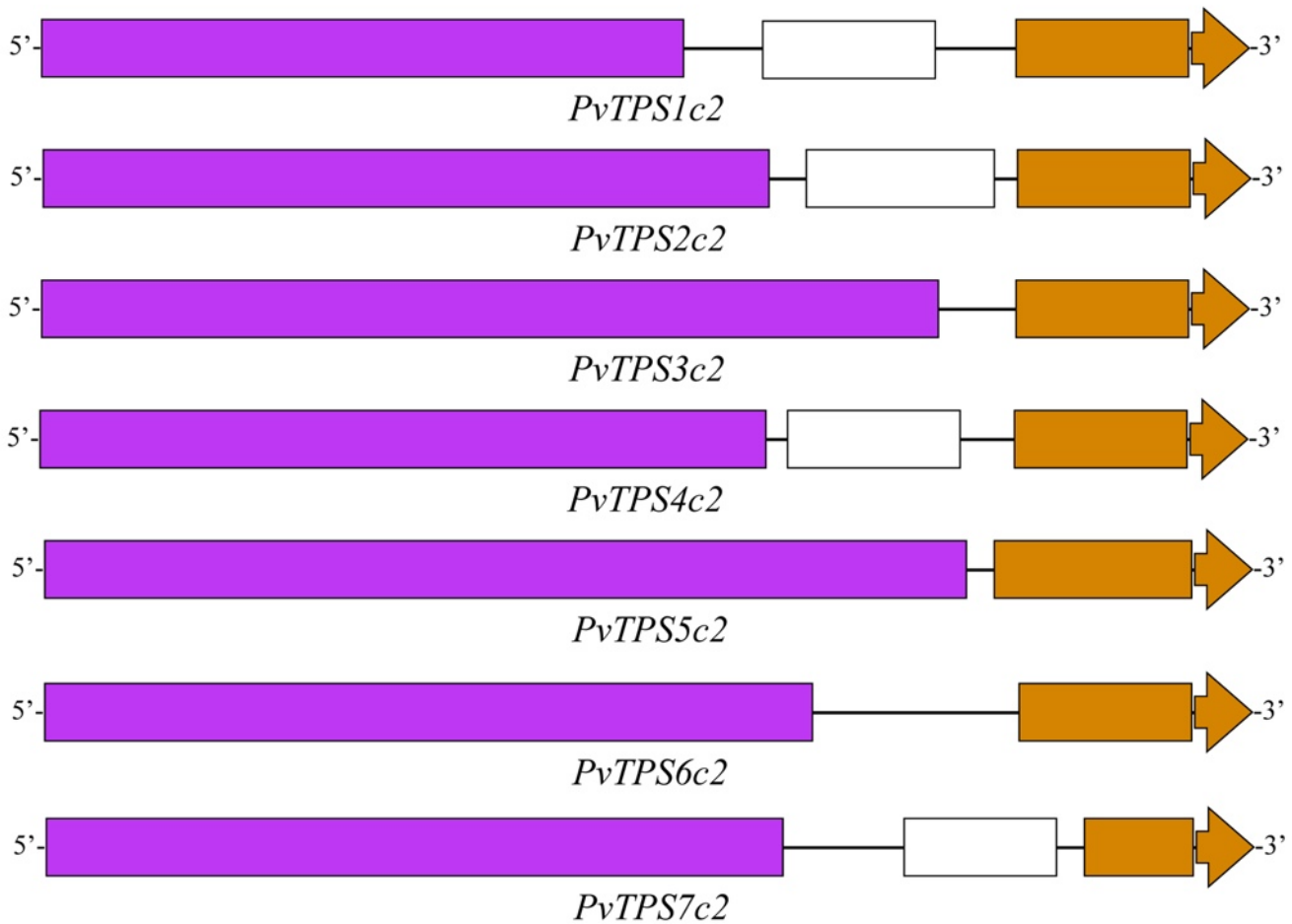


Figura 40. Estructura génica de los integrantes de la familia de TPSs clase II de *P. vulgaris*.

Las secuencias deducidas de amino ácidos de los integrantes de las familias génicas de TPS clase I y TPS clase II se alinearon con sus respectivos homólogos de *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *E. coli* y *R. etli* (Figura 39), para analizarlas con la paquetería de análisis de secuencias de MEGA5.0 (Figura 41) (Tamura *et al.*, 2011).

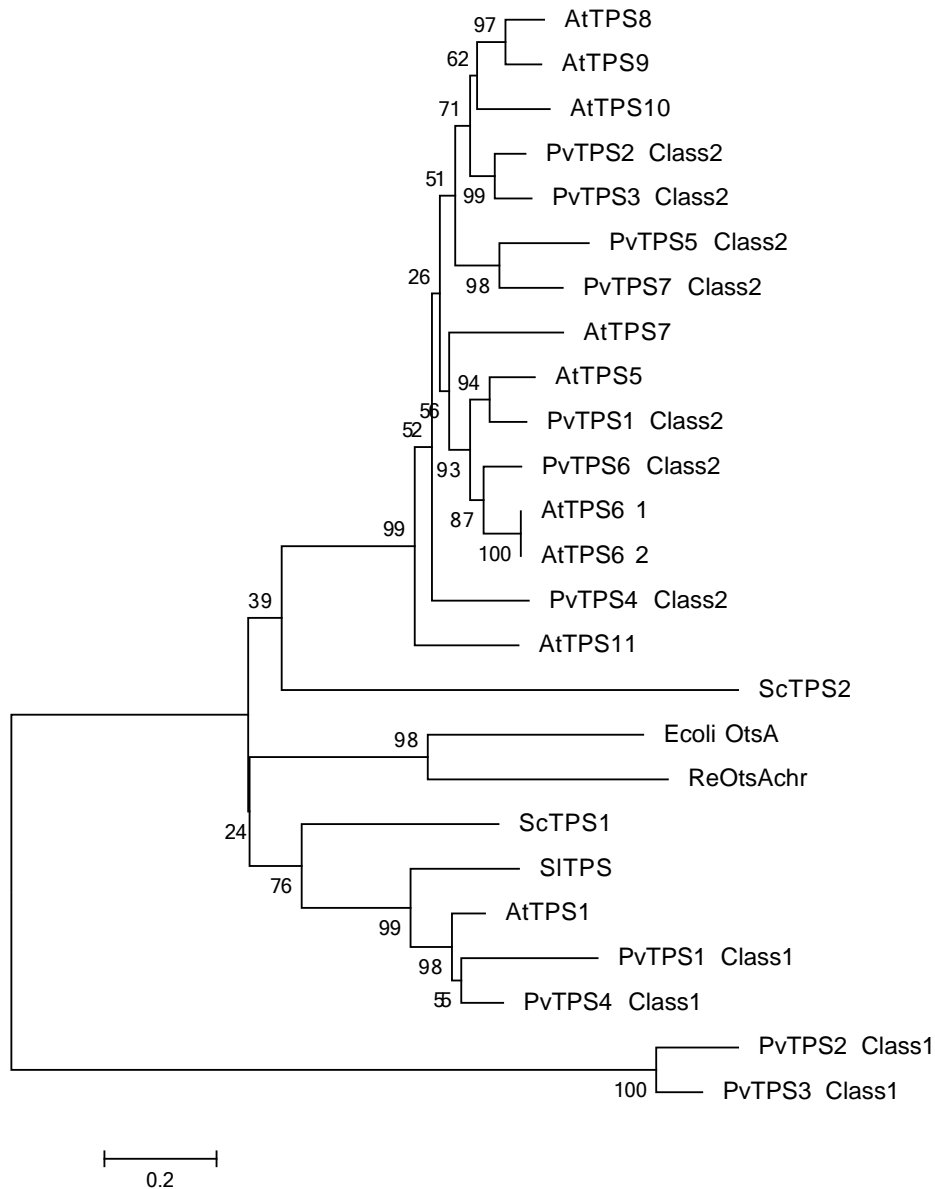


Figura 41. Árbol filogenético de los integrantes de las familias de TPS clase I y clase II de *P. vulgaris*. Los integrantes de las familias de TPS se compararon con sus correspondientes homólogos de *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *S. lepidophylla*, *E. coli* y *R. etli*.

El árbol filogenético generado del alineamiento de las familias de TPSs clase I y clase II de *P. vulgaris* con sus homólogos en *Arabidopsis*, *S. cerevisiae*, *E. coli* y *R. etli* agrupó a los integrantes de cada familia génica en tres clados (Figura 41). PvTPS1class1 y PvTPS4class1, integrantes de la familia de TPSs clase I se agruparon en el mismo clado de las TPSs clase I de *Arabidopsis* (AtTPS1), *S. lepidophylla* (SITPS), *S. cerevisiae* (ScTPS1), *E.coli* (OtsA) y *R. etli* (ReOtsAchr); lo que ayuda a confirmar que estos son integrantes de las TPSs clase I por el grado de conservación de las secuencias (Leyman *et al.*, 2001). En contraste, PvTPS2class1 y PvTPS3class1 se agruparon en un clado aparte de las TPSs clase I, y de las TPSs clase II; este resultado esta acorde a la ausencia de 8 residuos del

dominio catalítico de la región N-terminal, correspondiente al dominio TPS (Figura 39). PvTPS1-7class2 se agruparon en el mismo clado de las TPSs clase II de *Arabidopsis* (AtTPS5-11) y *S. cerevisiae* (ScTPS2); confirmando a este nivel que en efecto son TPSs clase II por el grado de conservación de las secuencias (Leyman *et al.*, 2001).

4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *PvTPS6c2* DURANTE EL DESARROLLO DE LOS NÓDULOS

El fragmento correspondiente a la región reguladora de la expresión génica de *PvTPS6c2* se amplificó mediante PCR, y este se clonaron en el vector pBGWFS7, para así fusionar la región reguladora de la expresión génica con las secuencias codificantes de los genes reporteros de la *proteína verde fluorescente* (GFP) y la β -glucuronidasa (GUS) (pPvTPS6c2::*GFP*:*GUS*). Esto con el fin de efectuar el análisis de expresión de *PvTPS6c2* mediante la tinción de las raíces noduladas por la degradación de X-gula mediada por GUS (Jefferson *et al.*, 1987).

Los ensayos de GUS en raíces noduladas indican que la expresión de *PvTPS6c2* es mayoritaria en los nódulos (Figura 42). Este resultado confirma los resultados del análisis bioinformático de la región reguladora de la expresión génica de *PvTPS6c2*, la presencia ocho motivos de activación de la expresión génica durante la nodulación, la expresión de *PvTPS6c2* mayoritaria en los nódulos.

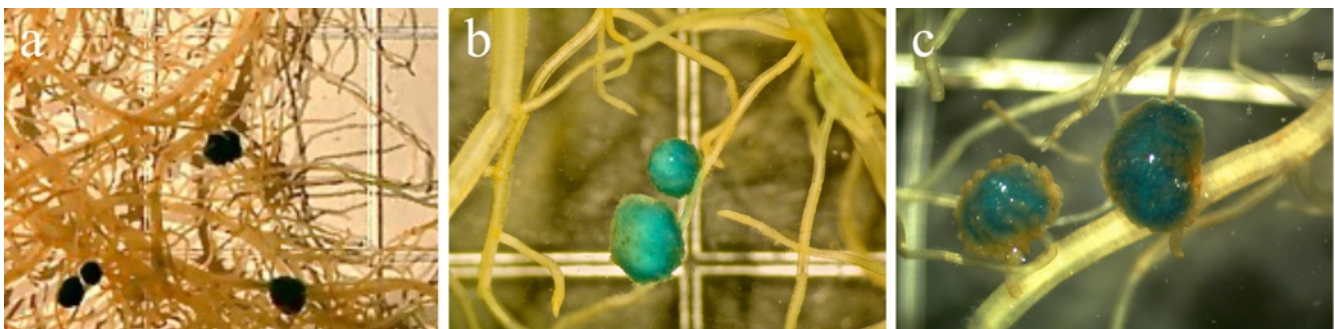


Figura 42. Análisis de expresión de *PvTPS6c2* en raíces noduladas de *P. vulgaris*, con la fusión de la región reguladora de la expresión génica de *PvTPS6c2* al gen reportero *GUS*. a) Raíces noduladas después del ensayo de tinción de GUS. b-c) Acercamientos a los nódulos de las raíces de *P. vulgaris* después del ensayo de tinción de GUS.

Se llevó a cabo la determinación del perfil de expresión de *PvTPS6c2* durante distintas etapas de desarrollo del nódulo (14 dpi, 21 dpi, 25 dpi y 28 dpi). El perfil de expresión de *PvTPS6c2* determinado consistió en un incremento del 15% a los 21 dpi (con respecto a los 14 dpi), y se mantuvo prácticamente sin cambios a los 25 dpi (con respecto a los 21 dpi), y finalmente se determinó un incremento de alrededor del 58% a los 28 dpi (con respecto a los 14 dpi) (Figura 43). El perfil de expresión de *PvSUS1* también se determinó al igual que en el perfil de expresión de *PvTRE1* (Figura 43).

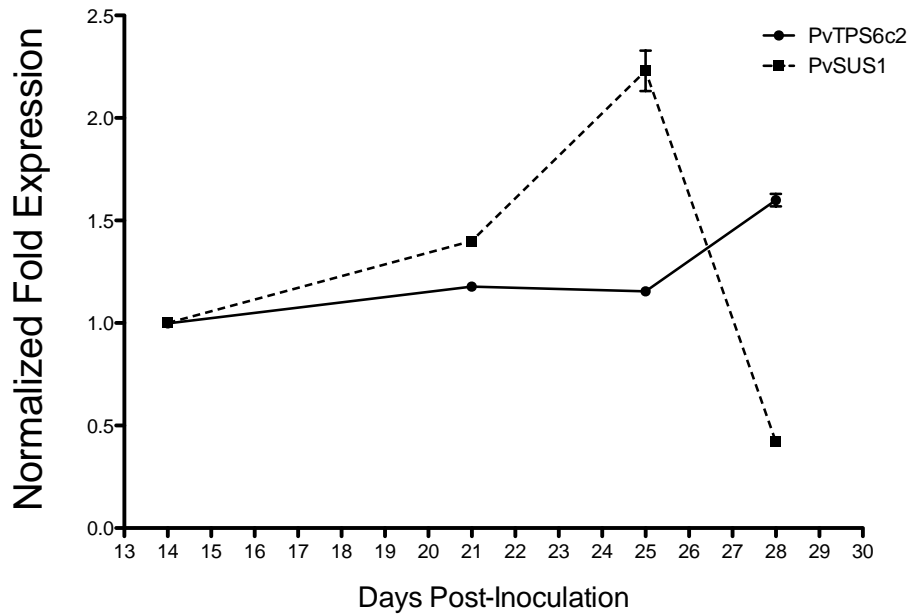


Figura 43. Determinación del perfil de expresión de *PvTPS6c2* en nódulos de 14 dpi, 21 dpi, 25 dpi, y 28 dpi, por medio de qRT-PCR, usando el gen de referencia el *PvEF1a*. Los resultados corresponden a seis experimentos independientes ($n=6$).

Además, se evaluaron la acumulación de transcrito de los integrantes de la familia de TPSs clase II y se compararon con la acumulación de transcrito de *PvTPS6c2*. La acumulación de transcrito de *PvTPS1c2* es 2.5 veces inferior respecto a la de *PvTPS6c2*, la acumulación de transcrito de *PvTPS2c2* es 20 veces inferior respecto a la de *PvTPS6c2*, la acumulación de transcrito de *PvTPS3c2* es 4.2 veces inferior respecto a la de *PvTPS6c2*, la acumulación de transcrito de *PvTPS4c2* es 5.3 veces inferior respecto a la de *PvTPS6c2*, la acumulación de transcrito de *PvTPS5c2* es 4.8 veces inferior respecto a la de *PvTPS6c2*, y la acumulación de transcrito de *PvTPS7c2* es 66.7 veces inferior respecto a la de *PvTPS6c2* (Figura 44).

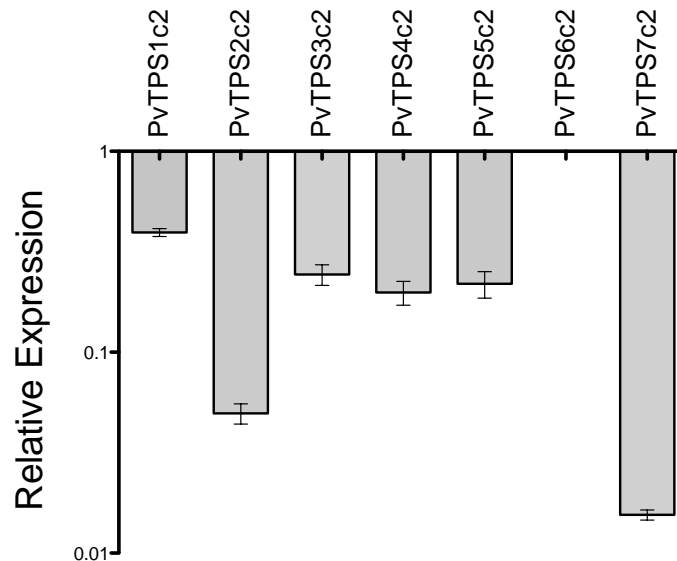


Figura 44. Perfil de expresión de las TPSs clase II con respecto al nivel de acumulación de transcrito de *PvTP6Sc2* mediante qRT-PCR. Los resultados corresponden a seis experimentos independientes ($n=6$).

4.3 SILENCIAMIENTO DE *PvTPS6c2* Y EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DE CARBONO, CRECIMIENTO Y DESARROLLO, Y AUTOFAGIA

La acumulación de transcrito de *PvTPS6c2* en nódulos transgénicos de 21 dpi con la construcción pTdT-PvTPS6c2-RNAi para disminuir la acumulación de transcrito de *PvTPS6c2* por medio de RNAi (*PvTPS6c2*-RNAi), se determinó por medio de qRT-PCR. La disminución en la acumulación de transcrito de *PvTPS6c2* en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi fue de aproximadamente un 85% (Figura 45).

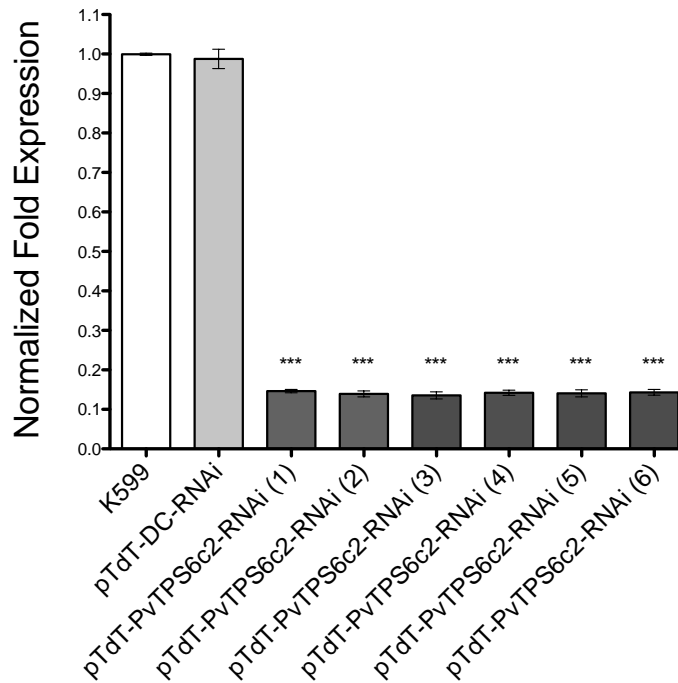


Figura 45. Determinación de la disminución en la acumulación de transcrito de *PvTPS6c2* en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. Los resultados de acumulación de transcrito corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcrito de *PvTPS6c2* en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($*** < P=0.001$).

Al disminuir los niveles de acumulación de transcrito de *PvTPS6c2* (85%) en nódulos de *P. vulgaris* se evaluó el efecto sobre la acumulación de transcrito de genes del metabolismo del carbono (*PvSUS1*, *PvHXX1*), desarrollo y crecimiento (*PvTOR*, *PvSnRK1*), y autofagia (*PvATG3*, *PvBeclin*) mediante qRT-PCR. La acumulación de transcrito de los genes analizados del metabolismo del carbono (*PvSUS1*, *PvHXX1*), de desarrollo y crecimiento (*PvSnRK1*), y de autofagia (*PvATG3*) registraron incremento de 145%, 99%, 55% y 57% en su acumulación de transcrito, respectivamente (Figura 46); en cambio, *PvTOR* de desarrollo y crecimiento, y *PvBeclin* de autofagia registraron descenso de 43% y 52% en su acumulación de transcrito, respectivamente (Figura 46).

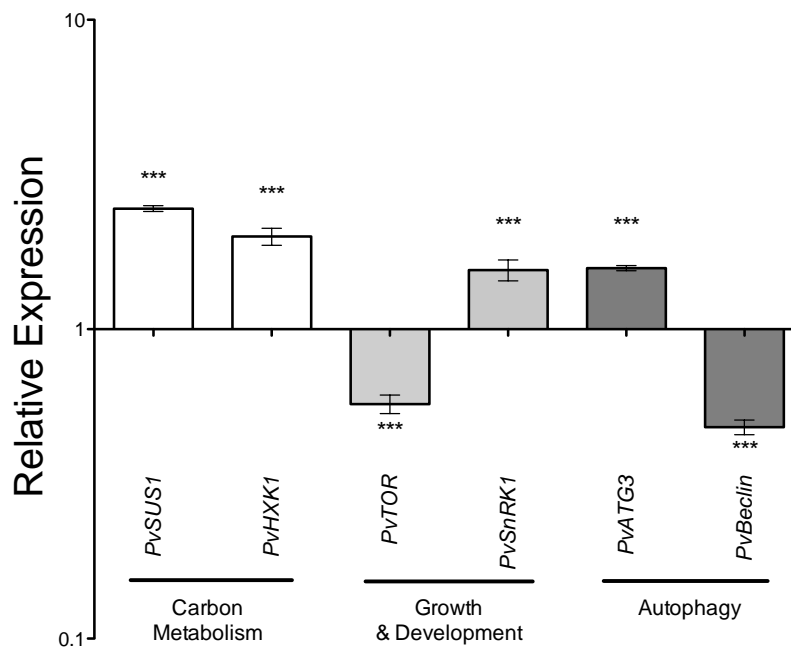


Figura 46. Análisis del cambio de acumulación de transcritos de genes del metabolismo del carbono, desarrollo y crecimiento, y autofagia en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. La determinación de acumulación de transcritos de *PvSUS1*, *PvHXX1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*, *PvATG3*, y *PvBeclin* se muestran en escala logarítmica (Log_{10}). Los resultados de acumulación de transcritos corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcritos de *PvSUS1*, *PvHXX1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*, *PvATG3*, y *PvBeclin* en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas ($*** < P=0.001$).

4.4 ANÁLISIS DE LA ULTRA-ESTRUCTURA DE LOS NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE *PvTPS6c2*-RNAi

Los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se analizaron a nivel de ultra-estructura mediante TEM para determinar el impacto de la reducción en la acumulación de transcritos de *PvTPS6c2* y la alteración de la expresión de genes del metabolismo del carbono (*PvSUS1*, *PvHXX1*), desarrollo y crecimiento (*PvTOR*, *PvSnRK1*), y autofagia (*PvATG3*, *PvBeclin*). En los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi los bacteroides presentaron un incremento en su tamaño con respecto a los bacteroides de las células infectadas de los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 47).

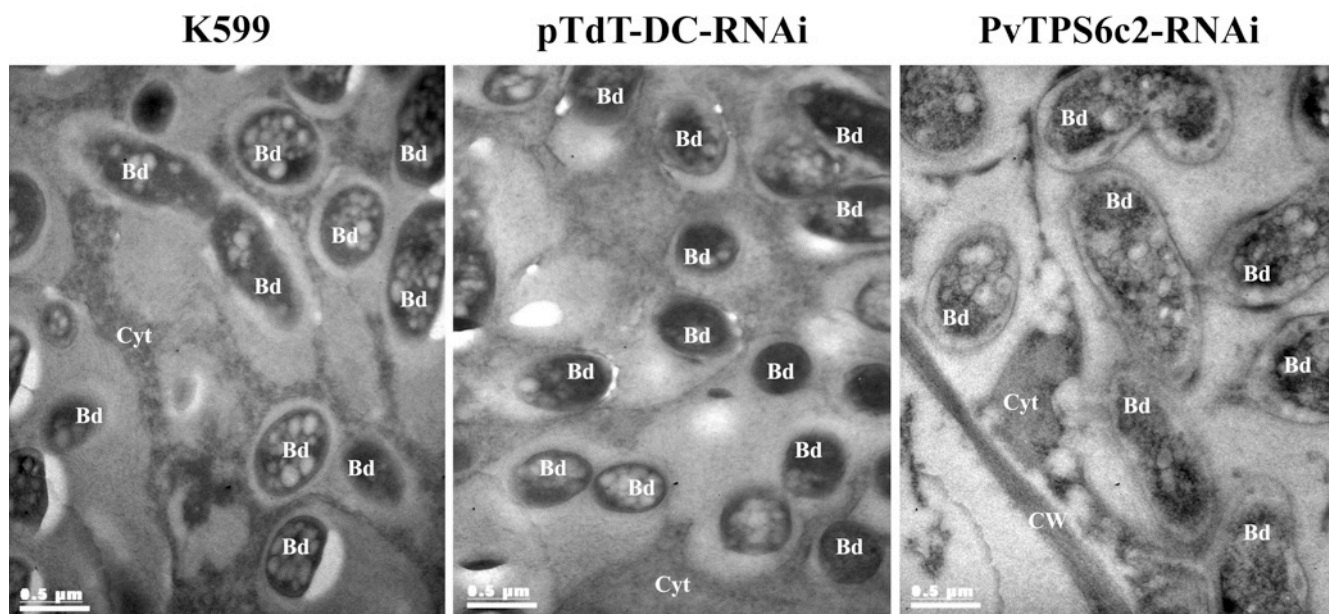


Figura 47. Ultra-estructura de nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. TEM de los bacteroides dentro de los nódulos de K599 (panel izquierdo), dentro de los nódulos de pTdT-DC-RNAi (panel central), y dentro de los nódulos de *PvTPS6c2*-RNAi (panel derecho), a una magnificación de 20000x. Las imágenes mostradas son representativas. Bd, bacteroides; Cyt, citoplasma; CW, pared celular.

4.5 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS DE NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE *PvTPS6c2*-RNAi

La acumulación de transcrito de *PvTPS6c2* en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi registró una reducción del 85%, y se evaluó la concentración de carbohidratos solubles en estos (fructosa, glucosa, sacarosa, y trehalosa) a los 21 dpi. El contenido de trehalosa en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se redujo aproximadamente un 30% en comparación con los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 48). El contenido de fructosa, glucosa, y sacarosa en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi no presentaron cambios significativos en su concentración con respecto al registrado en los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 48).

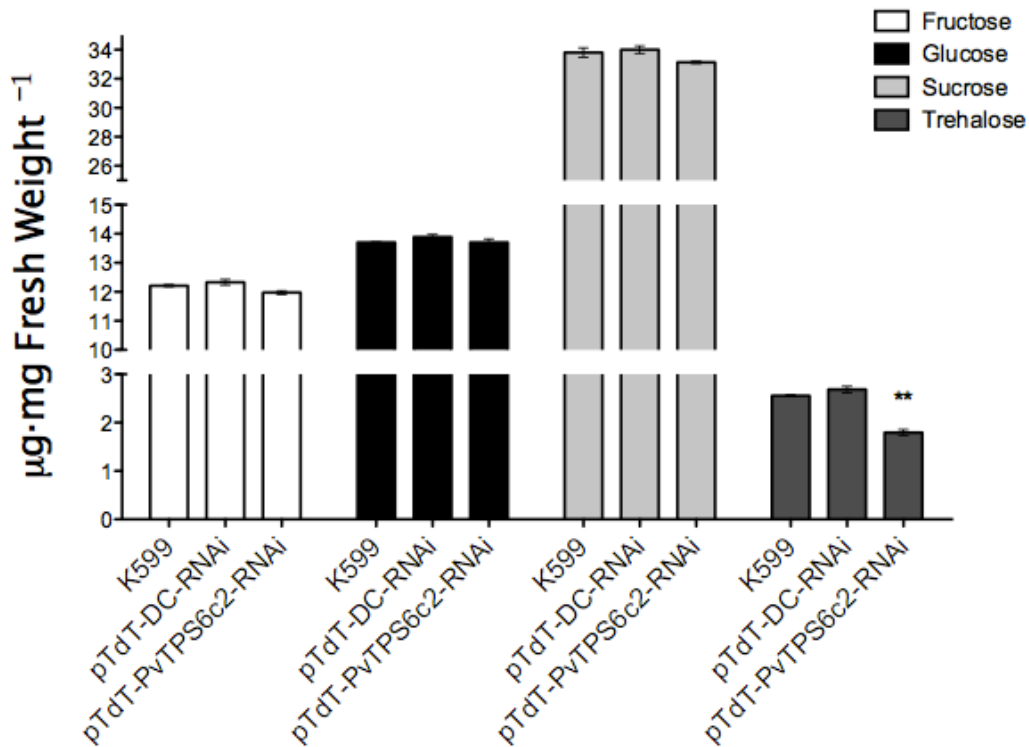


Figura 48. Análisis del contenido de carbohidratos solubles en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi, mediante HPLC. Los resultados de cuantificación de carbohidratos solubles corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del contenido de cada carbohidrato soluble fue mediante la aplicación de ANOVA seguido de una prueba de Dunnett (** $<P=0.01$).

4.6 ANÁLISIS DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LOS NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE *PvTPS6c2*-RNAi

Para determinar si el incremento en el tamaño de los bacteroides podría tener repercusiones en la viabilidad de los mismos, se evaluó su viabilidad re-aislándolos de los nódulos. La viabilidad de los bacteroides re-aislados se determinó mediante la producción de CFUs. Los bacteroides re-aislados de los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi formaron prácticamente la misma cantidad de CFUs por nódulo que los bacteroides re-aislados de los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 49).

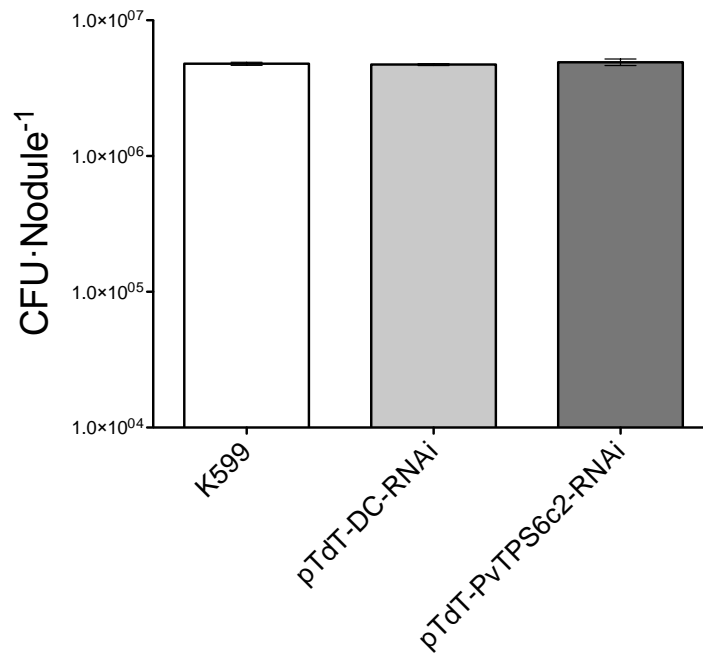


Figura 49. Unidades formadoras de colonias (CFUs), de bacteroides de *Rhizobium* re-aislados de nódulos transgénicos de *PvTPS6c2-RNAi*. Los resultados de las CFUs corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de las CFUs fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas.

Mediante el ensayo de reducción de acetileno, se evaluó la fijación de nitrógeno para determinar la capacidad de los bacteroides para reducir el N_2 , y producir NH_3 . En los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2-RNAi* no se registraron cambios significativos en la fijación de nitrógeno con respecto a la fijación de nitrógeno registrados en los nódulos control (K599, pTdt-DC-RNAi) (Figura 50).

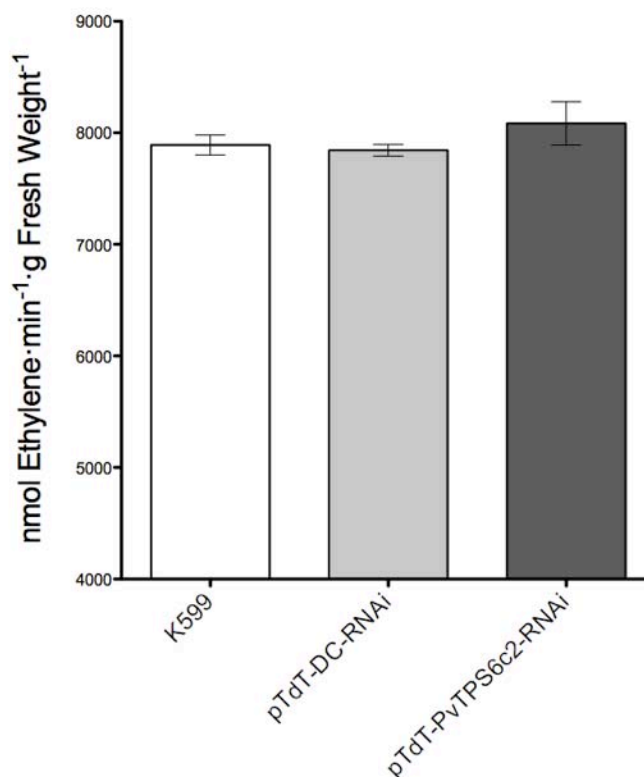


Figura 50. Determinación de la fijación de nitrógeno en nódulos de *PvTPS6c2-RNAi* mediante el ensayo de reducción de acetileno. Los resultados de la fijación de nitrógeno en los nódulos corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de la fijación de nitrógeno en los nódulos fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas.

La acumulación de transcrito de *PvGOGAT* y *PvGS* se evaluó mediante qRT-PCR en los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2-RNAi*, por estar directamente relacionados con la asimilación de nitrógeno en estos órganos. La acumulación de transcrito de *PvGOGAT* y de *PvGS*, en los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2-RNAi* se mantuvieron sin alteraciones significativas con respecto a la acumulación de transcrito de estos genes en los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 51).

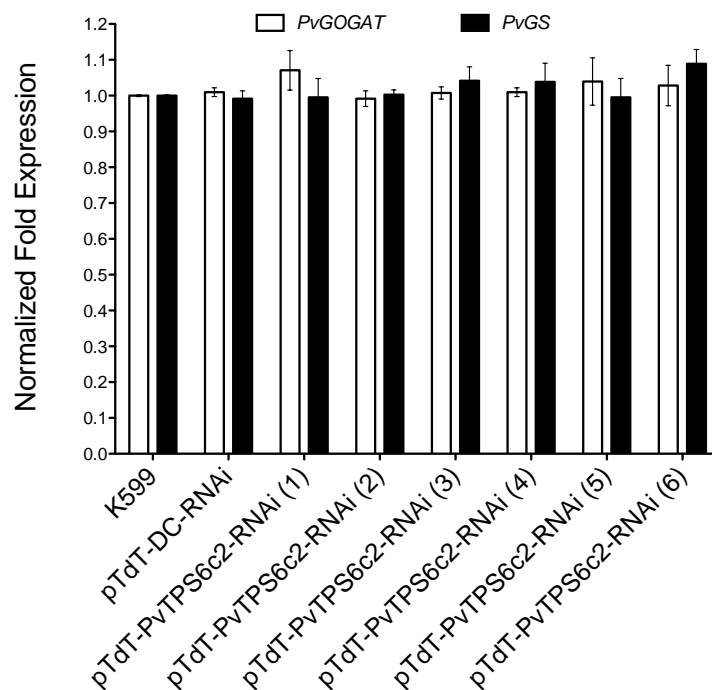


Figura 51. Determinación de la acumulación de transcritos de *PvGOGAT* y de *PvGS* en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. Los resultados de acumulación de transcritos de *PvGOGAT* y de *PvGS* corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcritos de *PvGOGAT* y de *PvGS* en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas.

La biomasa de los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se evaluó. Los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi tuvieron un incremento de aproximadamente 4 veces más biomasa con respecto a la biomasa evaluada en los nódulos control (K599, pTdt-DC-RNAi) (Figura 52).

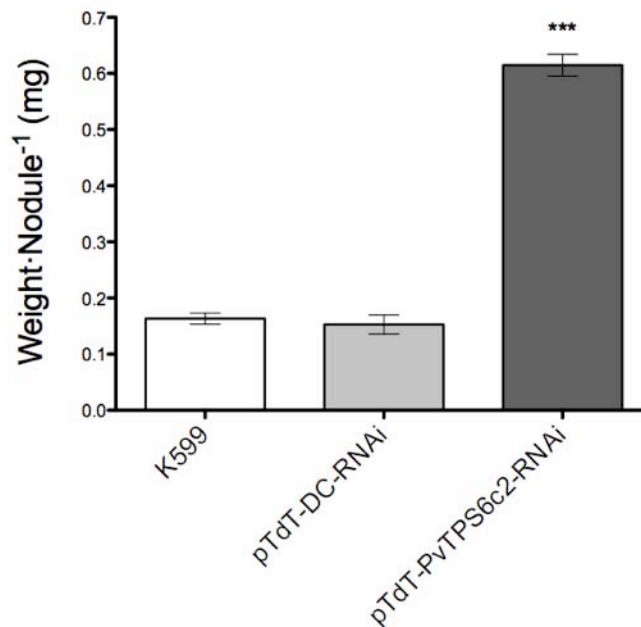


Figura 52. Biomasa de los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. Los resultados de la biomasa de los nódulos corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de la biomasa de los nódulos fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($***<P=0.001$).

La acumulación de los transcritos de todos los integrantes de la familia génica de las TPSs clase II se evaluó. Además de la reducción de la acumulación de transcritos de *PvTPS6c2* (85%), se registró la reducción de acumulación de transcritos de *PvTPS2c2* y *PvTPS5c2* (68% y 62%, respectivamente); en contraste, se registró el incremento de la acumulación de transcritos de *PvTPS3c2* y *PvTPS4c2* (3160% y 136%, respectivamente), y los niveles de acumulación de transcritos de *PvTPS1c2* y *PvTPS7c2* no registraron cambios significativos en su acumulación de transcritos (Figura 53).

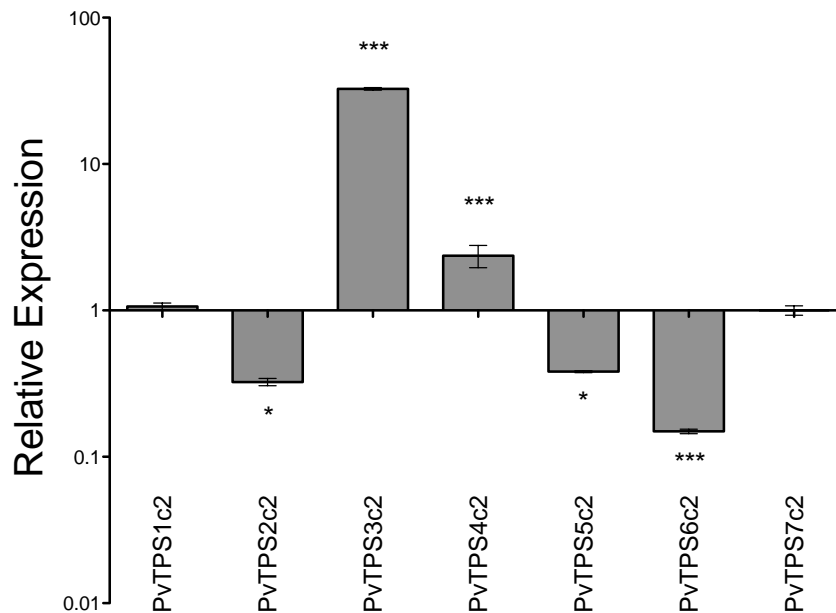


Figura 53. Análisis de acumulación de transcritos de la familia de las TPSs clase II (incluyendo a *PvTPS6c2*) en los nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. Los resultados de acumulación de transcritos de los integrantes de la familia de las TPSs clase II corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcritos de la familia de TPSs clase II en nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($*<P=0.05$, $***<P=0.001$).

4.7 ANÁLISIS DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LAS HOJAS DE LAS PLANTAS COMPUESTAS CON NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE *PvTPS6c2*-RNAi

Las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se analizaron. El perfil del contenido de carbohidratos solubles en las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se evaluó mediante la cuantificación de los mismos con el uso del HPLC. En las hojas de plantas compuestas de frijol con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se determinó la reducción de aproximadamente el 30% del contenido de trehalosa en comparación con hojas de plantas compuestas de frijol con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 54). En cambio, el contenido de fructosa, glucosa, y sacarosa en las hojas de plantas compuestas de frijol con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi no registró alteraciones

significativas con respecto al contenido de estos en las hojas de plantas compuestas de frijol con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 54).

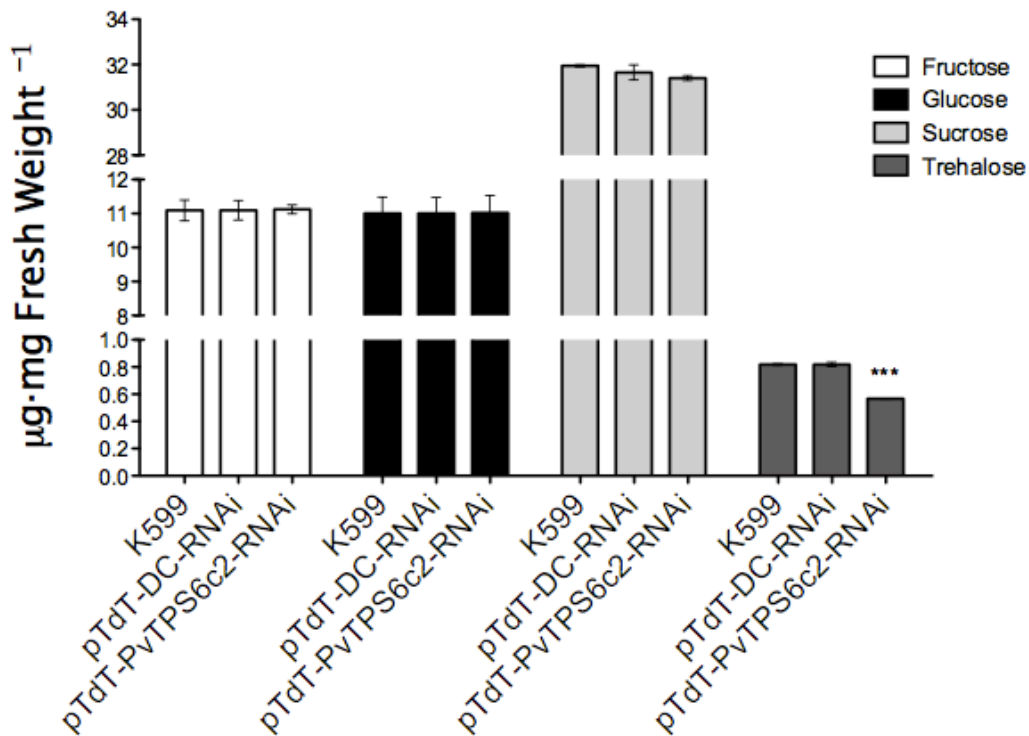


Figura 54. Análisis del contenido de carbohidratos solubles en hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. Análisis del contenido de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa, sacarosa, y trehalosa), mediante HPLC. Los resultados de cuantificación de carbohidratos solubles corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del contenido de cada carbohidrato soluble fue mediante la aplicación de ANOVA seguido de una prueba de Dunnett ($***<P=0.001$).

La reducción del contenido de trehalosa en las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi podría provocar un efecto negativo en el contenido relativo de agua (RWC) de este órgano. Por lo tanto, se evaluó el RWC en estos órganos. En las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi no se registró un cambio significativo del RWC con respecto a las hojas de plantas compuestas de frijol con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 55).

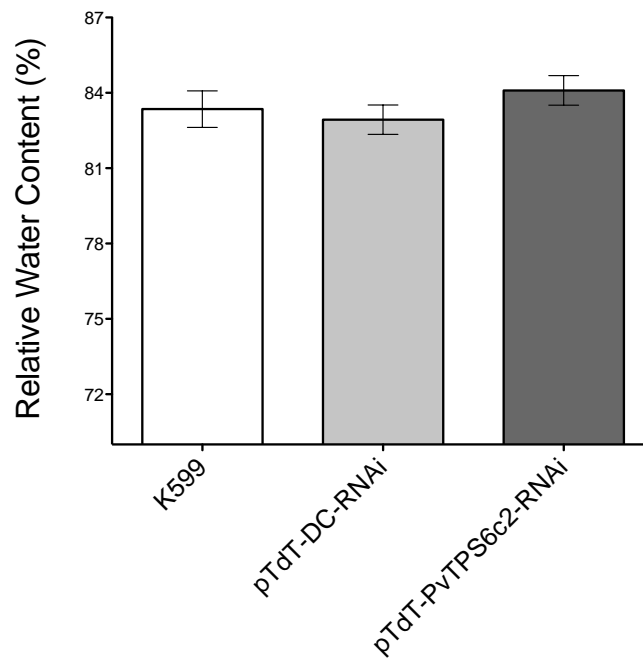


Figura 55. Contenido relativo de agua (RWC) de hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. Los resultados de RWC en las hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de RWC en hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas.

La biomasa o peso seco de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se evaluó. El peso seco de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se registró una reducción aproximada del 36% con respecto a la biomasa de las hojas de plantas compuestas de frijol con nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 56).

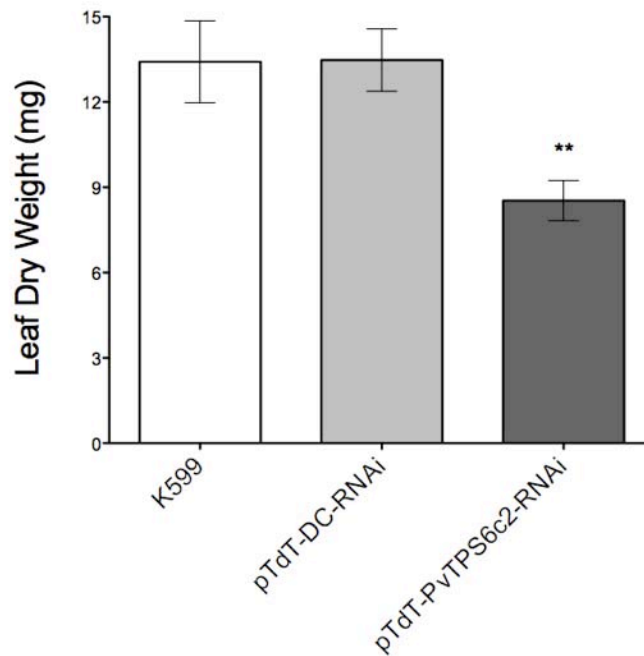


Figura 56. Peso seco o biomasa de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. Los resultados del peso seco en las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del peso seco en hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas (** $<P=0.01$).

Por último, el área foliar de las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi se evaluó. El área foliar de las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi presentó una reducción aproximada del 36% con respecto al área foliar de las hojas de plantas compuestas de frijol con nódulos control (K599, pTdt-DC-RNAi) (Figura 57).

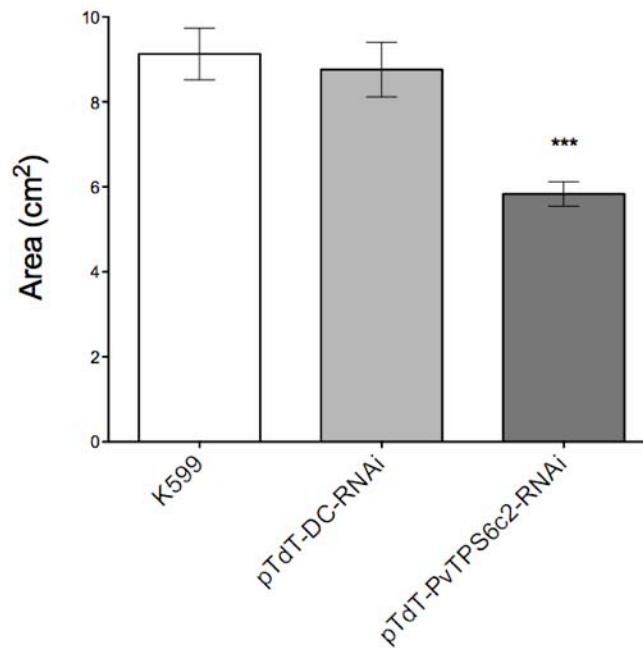


Figura 57. Área foliar de hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi. Los resultados del área foliar en las hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del área foliar en las hojas de plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2*-RNAi fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas (***) $<P=0.001$).

5. pCAMRT2 (SOBRE-EXPRESIÓN DE LA *TPS* HETERÓLOGA DE *R. etli*)

La sobre-expresión del marco de lectura abierto de la *TPS* cromosomal de *R. etli* (*ReTPS*) en raíces y nódulos transgénicos de *P. vulgaris* se llevo a cabo clonando en fase (en su región 3'-codificante o C-terminal) con el gen reportero de la *proteína verde fluorescente* (*GFP*) y la expresión de esta fusión transcripcional regulada por el promotor CaMV35S que dio lugar a la construcción pCaMV35S:*ReTPS*::*GFP* (pCAMRT2). La construcción pCAMRT2 se introdujo en *A. rhizogenes* K599 mediante electroporación, y se designó como pCAMRT2. La presencia de pCAMRT2 se determinó con el análisis de imágenes por microscopía láser confocal (CLSM). Los nódulos transgénicos de pCAMRT2 mostraron emisión de fluorescencia verde a $\lambda_{509\text{nm}}$ (Figura 58); la fluorescencia roja emitida en las imágenes de la Figura 58 corresponden a los bacteroides de *R. etli* expresando el gen reportero DsRed a $\lambda_{586\text{nm}}$, para contrastar la fluorescencia emitida entre las células infectadas y no infectadas de los nódulos transgénicos de pCAMRT2.

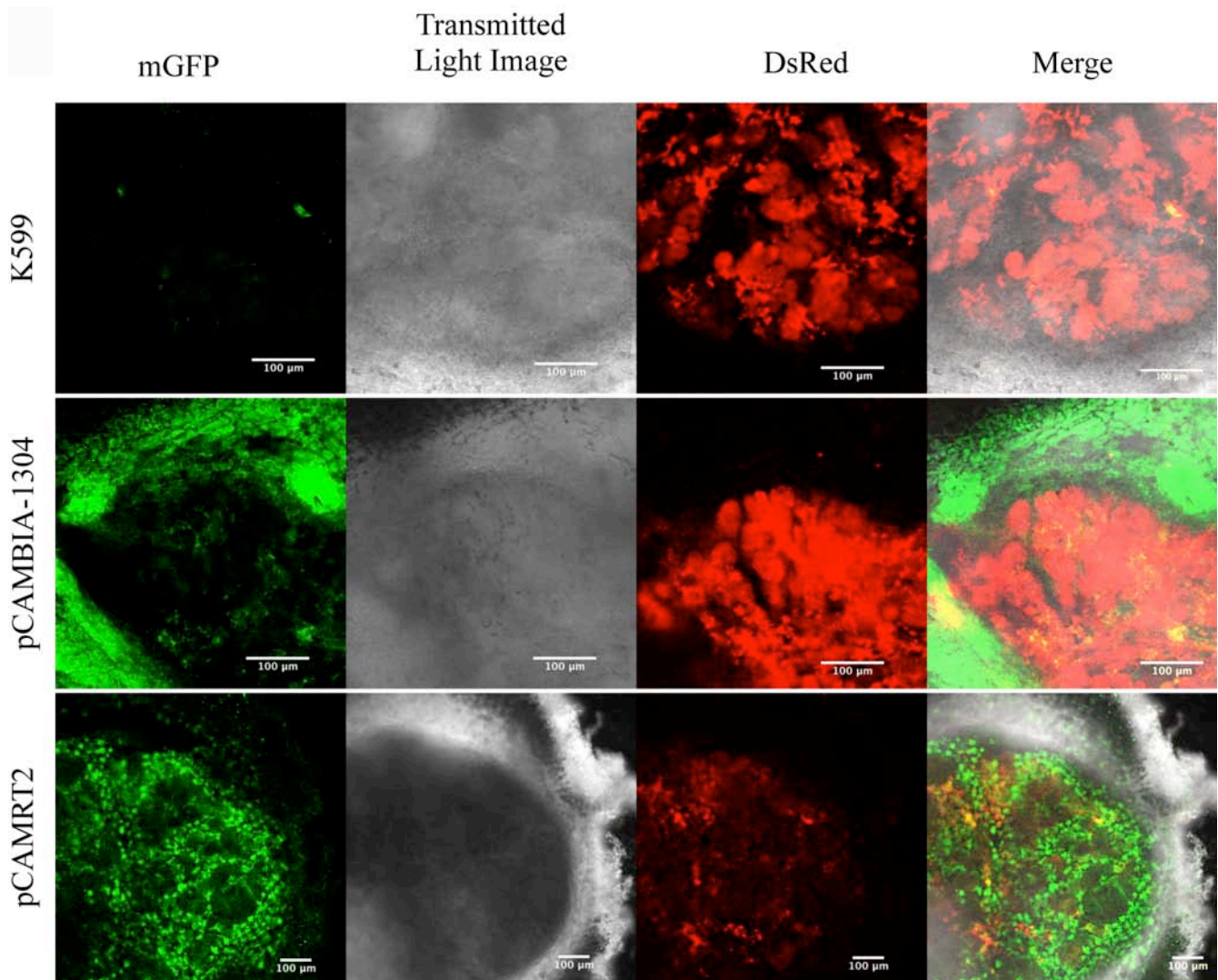


Figura 58. Análisis de imágenes por microscopía láser confocal (CLSM) de nódulos transgénicos de pCAMRT2. La primera fila corresponde a nódulos de K599 (control) sin construcción alguna, en la que sólo se muestra la emisión de fluorescencia roja (DsRed) de las células infectadas con los bacteroides de *R. etli* con la proteína reportera DsRed. La segunda fila corresponde a nódulos de pCAMBIA-1304 (control, vector vacío), en la que se muestra la emisión de fluorescencia verde (mGFP) de las células del nódulo, y emisión de fluorescencia roja (DsRed) de las células infectadas con los bacteroides de *R. etli* con la proteína reportera DsRed. La tercera fila corresponde a nódulos de pCAMRT2, en la que se muestra la emisión de fluorescencia verde (mGFP) de las células de nódulo, y emisión de fluorescencia roja (DsRed) de las células infectadas con los bacteroides de *R. etli* con la proteína reportera DsRed. Se incluyen las columnas con las imágenes de luz transmitidas (“transmitted light image”) y la superposición de todos los canales usados (“merge”).

5.1 ANÁLISIS DE LA ZONA CENTRAL DE LOS NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE pCAMRT2, PRODUCCIÓN DE TREHALOSA Y VIABILIDAD DE LOS BACTEROIDES

La emisión de fluorescencia verde de la fusión de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 mostró una distribución distinta de la fluorescencia verde/roja con respecto a la distribución de fluorescencia verde/

roja observada en nódulos control (pCAMBIA-1304) (Figura 58). La distribución diferencial de fluorescencia verde/roja se analizó a más detalle, y también se analizaron cortes de nódulos transgénicos de pCAMRT2 y nódulos control (pCAMBIA-1304) teñidos con azul de toluidina mediante microscopía óptica para determinar la distribución de células infectadas y de las células no infectadas en la zona central de los nódulos. En los nódulos transgénicos de pCAMRT2, al ser analizados mediante CLSM, se observó la emisión de fluorescencia verde en la zona central de los mismos, y a su vez poca emisión de fluorescencia roja en la zona central (Figura 59); en contraste con los nódulos control (pCAMBIA-1304) la emisión de fluorescencia verde es de escasa a nula, y la emisión de fluorescencia roja es la predominante, en la zona central. Los análisis por microscopía óptica de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 se pueden distinguir las células infectadas de las células no infectadas en la zona central, al igual que en los nódulos control (pCAMBIA-1304) (Figura 59).

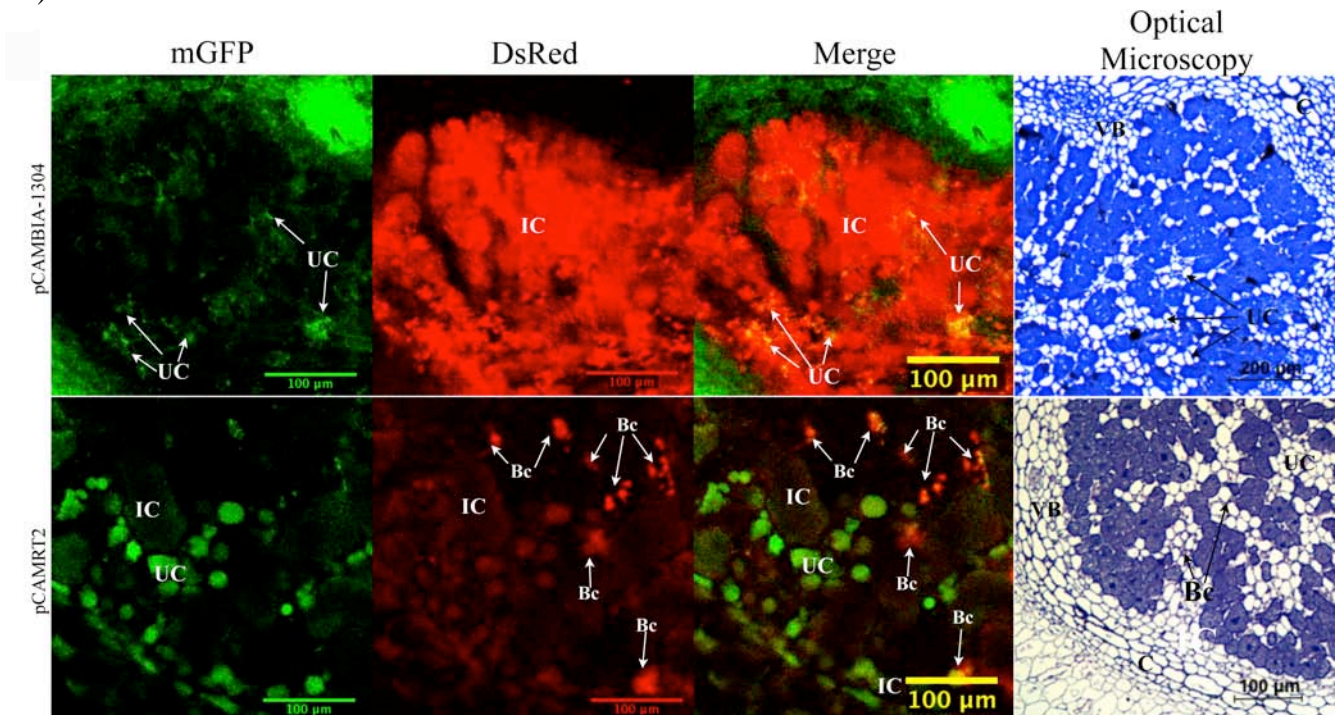


Figura 59. Análisis de imágenes por CLSM y microscopía óptica de nódulos transgénicos de pCAMRT2. La primera fila corresponde a nódulos de pCAMBIA-1304 (control, vector vacío), en la que se muestra la emisión de fluorescencia verde (mGFP) de las células del nódulo, y emisión de fluorescencia roja (DsRed) de las células infectadas con los bacterioides de *R. etli*. La segunda fila corresponde a nódulos de pCAMRT2, en la que se muestra la emisión de fluorescencia verde (mGFP) de las células de nódulo, y emisión de fluorescencia roja (DsRed) de las células infectadas con los bacterioides de *R. etli*. Se incluyen las columnas con la superposición de todos los canales usados (“merge”) y de microscopía óptica (“optical microscopy”).

Las células infectadas de la zona central de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 se analizaron a mayor detalle, a un aumento de 100x, para detallar la presencia de bacterioides en las células infectadas. Las células infectadas de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 poseen células infectadas y una acumulación aparentemente mayor de bacterioides que la observada dentro de las células infectadas de los nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 60). Esto contrasta con las imágenes de CLSM en

donde se observa la carencia de emisión de fluorescencia roja de los bacteroides en las células infectadas de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 (Figura 59).

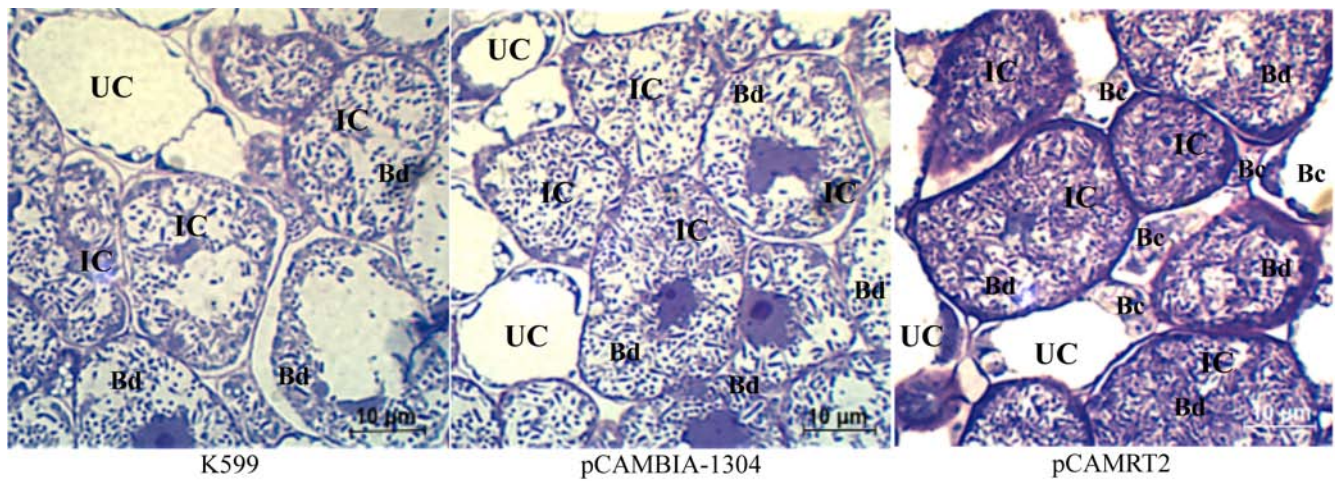


Figura 60. Imágenes de microscopía óptica de células infectadas de nódulos transgénicos de pCAMRT2. Aumento 100x. Detalle de células infectadas de nódulos transgénicos de pCAMRT2 y de nódulos control (K599, pCAMBIA-1304). IC, célula infectada; UC, célula no infectada; Bd, bacteroide; Bc, bacteria.

Para determinar que pCAMRT2 es funcional, se analizó el contenido de trehalosa de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 mediante HPLC. El contenido de trehalosa en nódulos transgénicos de pCAMRT2 incrementó aproximadamente un 50% con respecto al contenido de trehalosa de nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 61).

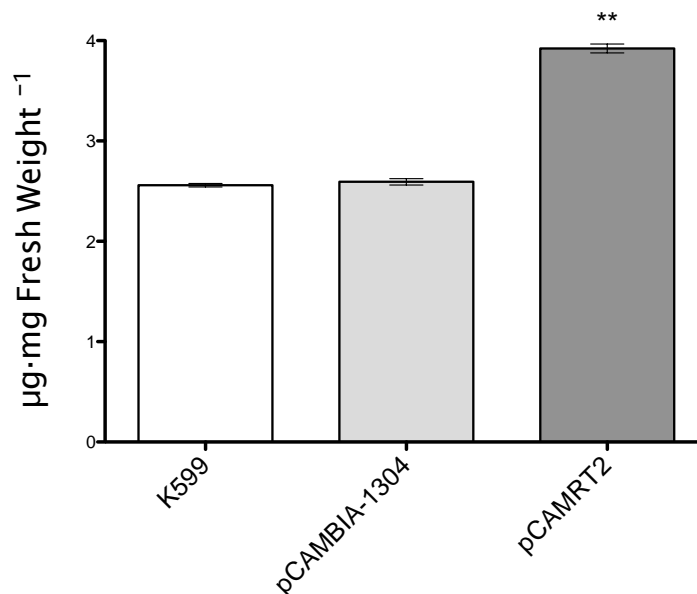


Figura 61. Determinación del contenido de trehalosa en nódulos transgénicos de pCAMRT2. Los resultados del contenido de trehalosa corresponden a tres plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del contenido de trehalosa de nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas (** $< P=0.01$).

Debido al contraste entre las micrografías de CLSM y las de microscopía óptica de la zona central de los nódulos transgénicos de pCAMRT2, en donde se determina la ausencia de emisión de fluorescencia roja por parte de los bacteroides dentro de las células infectadas (CLSM), pero también en donde se muestra la presencia de bacteroides dentro de las mismas (microscopía óptica); lo que indica que posiblemente la viabilidad de los bacteroides dentro de las células infectadas de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 está afectada negativamente. Para determinar la viabilidad (CFUs) de los bacteroides se realizó su re-aislamiento. La producción de CFUs de los *Rhizobium* re-aislados de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue un 50% menor con respecto a las CFUs producidos por los *Rhizobium* re-aislados de los nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 62).

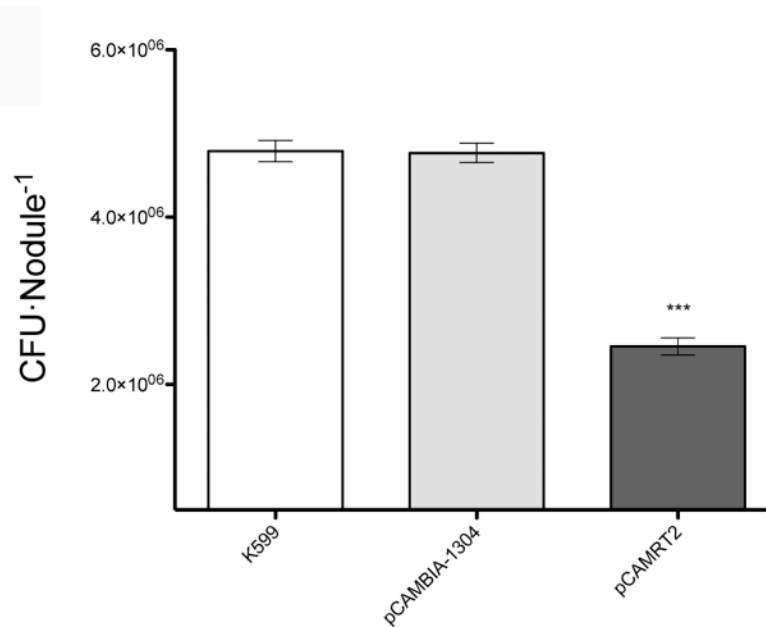


Figura 62. Re-aislamiento de *Rhizobium* de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 y determinación de las unidades formadoras de colonias (CFU). Los resultados de las CFUs corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de las CFUs fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($***<P=0.001$).

5.2 EFECTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL METABOLISMO DE CARBONO, CRECIMIENTO Y DESARROLLO, AUTOFAGIA Y ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN NÓDULOS DE pCAMRT2

La acumulación de transcrito de genes del metabolismo de carbono (*PvSUS1*, *PvHXX1*), desarrollo y crecimiento (*PvTOR*, *PvSnRK1*), y autofagia (*PvATG3*, *PvBeclin*), así como también la acumulación de transcrito de los integrantes de la familia génica de TPS clase II de *P. vulgaris* (*PvTPS1c2-7c2*) se evaluaron en los nódulos transgénicos de pCAMRT2. El único gen que registró incremento en la acumulación de transcrito del 56% fue *PvSUS1* (metabolismo de carbono), los genes de desarrollo y crecimiento, *PvTOR* y *PvSnRK1*, registraron una reducción en la acumulación de transcrito del 31% y 31%, respectivamente; y la acumulación de transcrito de *PvBeclin* (autofagia) una reducción del 42%. Los genes que no registraron alteración significativa en su acumulación de transcrito fueron *PvHXX1* (metabolismo de carbono) y *PvATG3* (autofagia) (Figura 63).

La acumulación de transcrito *PvGOGAT* y *PvGS* también se evaluó en los nódulos transgénicos de pCAMRT2. La acumulación de transcrito de *PvGOGAT* y *PvGS* en los nódulos transgénicos de pCAMRT2 no registraron alteración significativa (Figura 63).

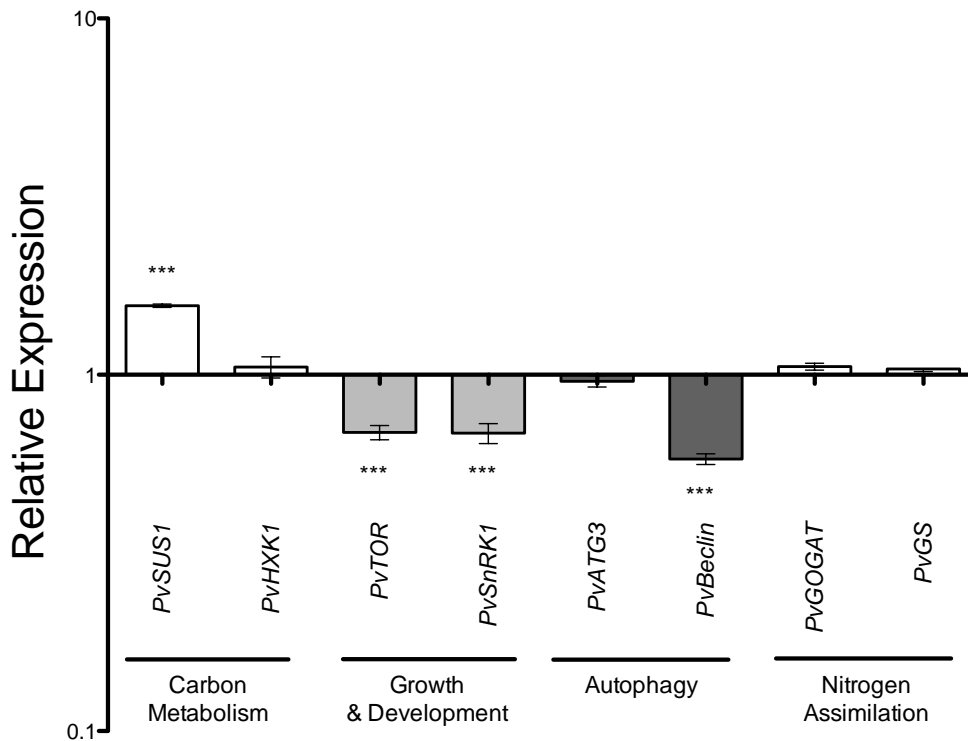


Figura 63. Análisis del cambio de acumulación de transcritos de genes del metabolismo del carbono, desarrollo y crecimiento, autofagia y asimilación de nitrógeno en nódulos transgénicos de pCAMRT2. La acumulación de transcrito de *PvSUS1*, *PvHXK1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*, *PvATG3*, *PvBeclin*, *PvGOGAT* y *PvGS* se muestran en escala logarítmica (Log_{10}). Los resultados de acumulación de transcrito corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcrito de *PvSUS1*, *PvHXK1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*, *PvATG3*, *PvBeclin*, *PvGOGAT* y *PvGS* en nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas ($*** < P=0.001$).

La acumulación de transcrito de los integrantes de la familia génica de las TPS clase II de *P. vulgaris* se evaluó en los nódulos transgénicos de pCAMRT2. Los niveles de acumulación de transcrito de los integrantes de la familia génica de las TPS clase II registraron una reducción generalizada, a excepción de *PvTPS1c2* que no registró alteración en su acumulación de transcrito, en nódulos transgénicos de pCAMRT2. *PvTPS2c2* y *PvTPS3c2* registraron reducciones en la acumulación de transcrito del 71%-75%; *PvTPS4c2*, *PvTPS5c2*, y *PvTPS7c2* registraron reducciones de acumulación de transcrito del 45%-49%, y *PvTPS6c2* registró reducción en la acumulación de transcrito del 35% (Figura 64).

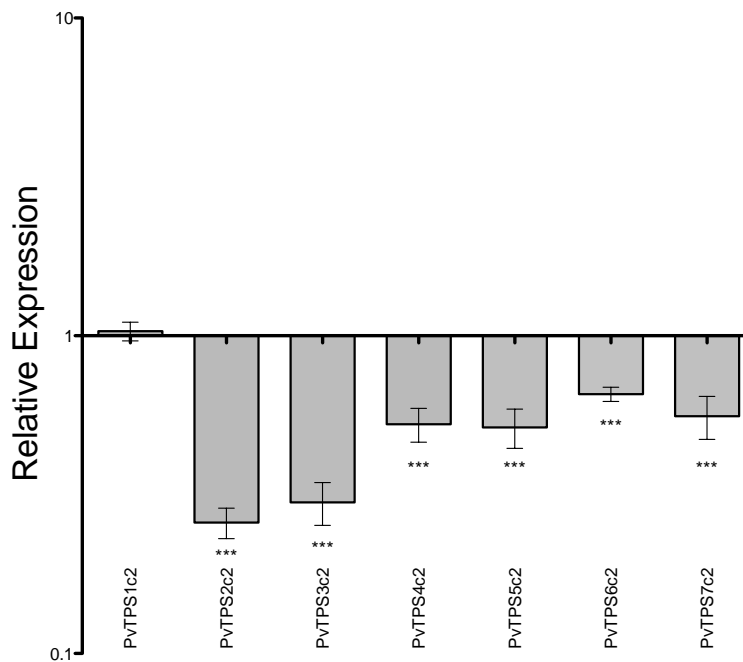


Figura 64. Análisis del cambio de acumulación de transcritos de los integrantes de la familia génica de las TPS clase II (*PvTPS1c2-7c2*) en nódulos transgénicos de pCAMRT2. La determinación de acumulación de transcritos de los integrantes de la familia génica de las TPSs clase II se muestran en escala logarítmica (Log_{10}). Los resultados de acumulación de transcritos corresponden a seis plantas compuestas ($n=6$), la determinación estadística de las diferencias de acumulación de transcritos de *PvTPS1c2-7c2* en nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas ($*** < P=0.001$).

5.3 ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES, FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y BIOMASA DE LOS NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE pCAMRT2

La concentración de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) en los nódulos transgénicos de pCAMRT2 se evaluó. El contenido de fructosa, glucosa y sacarosa en nódulos transgénicos de pCAMRT2 no presentaron cambios significativos en su concentración con respecto al registrado en los nódulos control (K599, pTdT-DC-RNAi) (Figura 65).

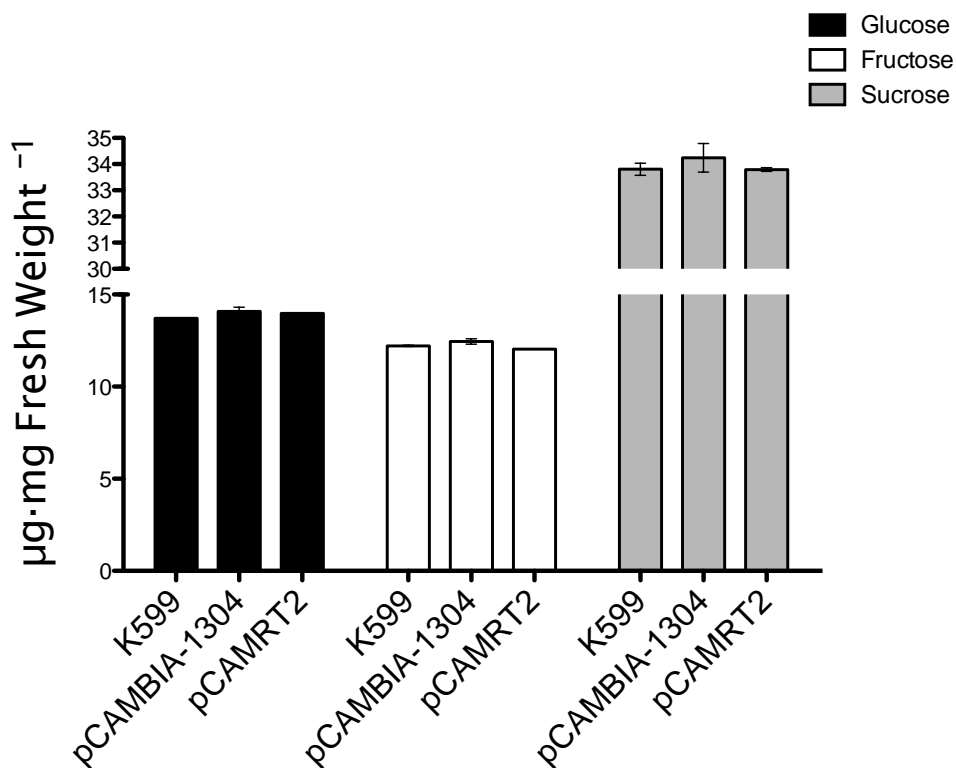


Figura 65. Análisis del contenido de carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) en nódulos transgénicos de pCAMRT2. Los resultados del contenido de los carbohidratos solubles analizados corresponden a tres plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del contenido de carbohidratos solubles de nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas.

Al determinar la disminución en la capacidad de formación de colonias (CFUs) de los *Rhizobium* re-aislados de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 se evaluó la capacidad de fijación de nitrógeno de los bacteroides en los mismos. La capacidad de fijación de nitrógeno (ensayo de reducción de acetileno) en los nódulos transgénicos de pCAMRT2 registró un decremento de aproximadamente el 20% con respecto a la registrada en los nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 66).

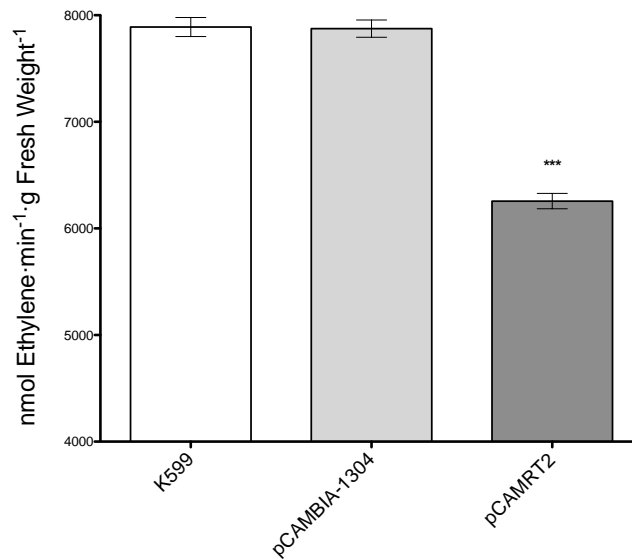


Figura 66. Determinación de la fijación de nitrógeno en nódulos de pCAMRT2 mediante el ensayo de reducción de acetileno. Los resultados de la fijación de nitrógeno en los nódulos corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de la fijación de nitrógeno en los nódulos fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($***<P=0.001$).

La biomasa de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue otro parámetro fisiológico que se evaluó. La biomasa de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 tuvo un incremento de 5.8 veces la biomasa de los nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 67).

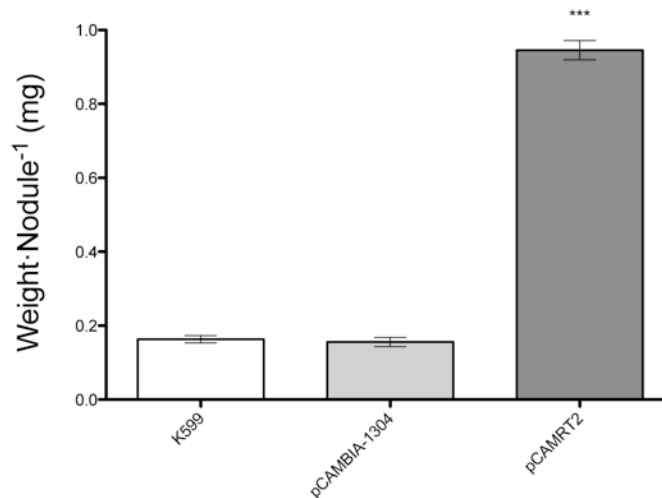


Figura 67. Biomasa de los nódulos transgénicos de pCAMRT2. Los resultados de la biomasa de los nódulos corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de la biomasa de los nódulos fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas ($***<P=0.001$).

5.4 ANÁLISIS DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE LAS HOJAS DE LAS PLANTAS COMPUESTAS CON NÓDULOS TRANSGÉNICOS DE pCAMRT2

En la parte aérea de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 se evaluó el contenido de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa, sacarosa y trehalosa), el área foliar, la

biomasa, y el contenido relativo de agua. El contenido de carbohidratos solubles, en general, no registraron cambios significativos en las hojas de las plantas compuestas con nódulos transgénicos de pCAMRT2 en comparación con las hojas de las plantas compuestas con nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 68).

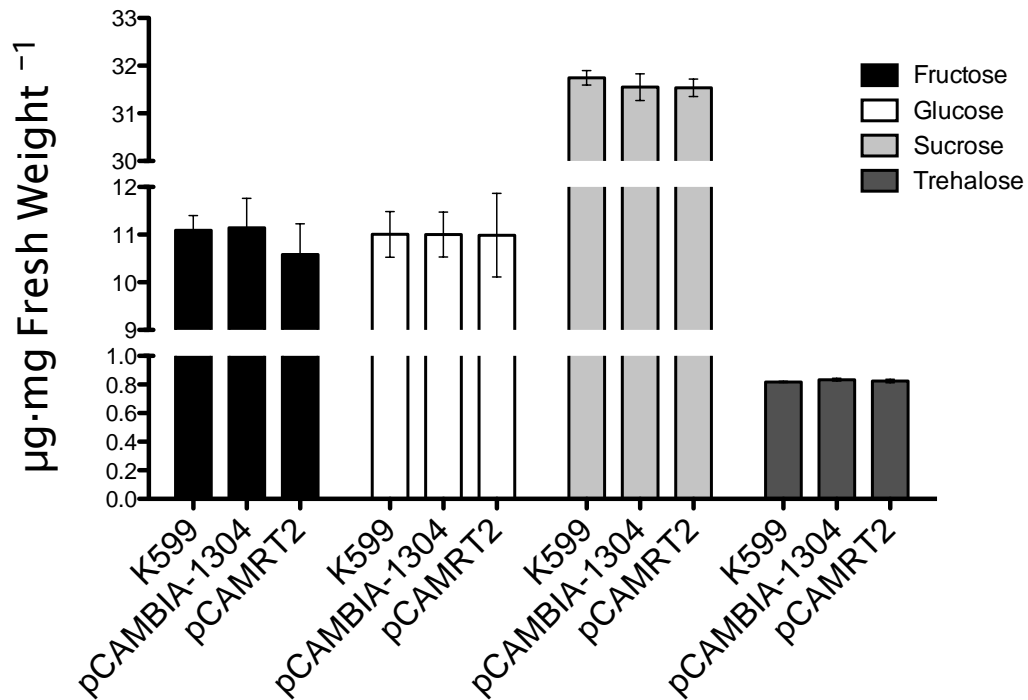


Figura 68. Análisis del contenido de carbohidratos solubles (fructosa, glucosa, sacarosa, y trehalosa) en hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2. Los resultados del contenido de los carbohidratos solubles analizados corresponden a tres plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del contenido de carbohidratos solubles de hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue mediante la prueba de t de Student a 2 colas.

El área foliar de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 se evaluó. El área foliar de las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 registraron un incremento del 34% con respecto a las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 69).

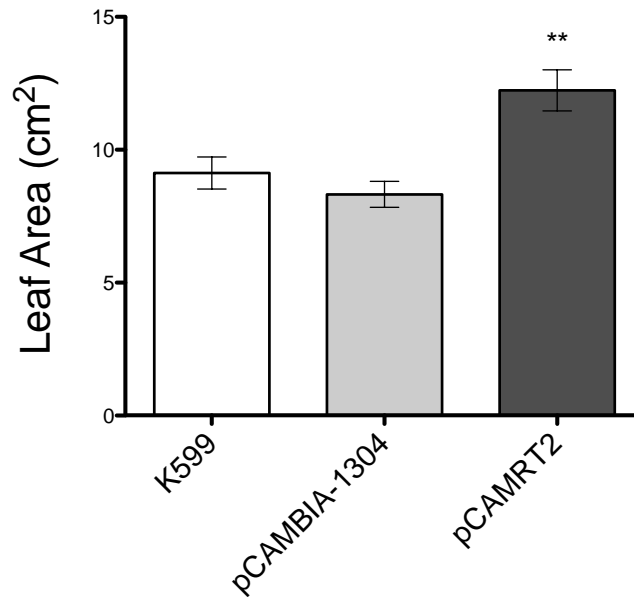


Figura 69. Área foliar de hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2. Los resultados del área foliar en las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del área foliar en las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas (** $<P=0.01$).

La biomasa (peso seco) de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 se evaluó. La biomasa de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 no registró alteración significativa con respecto a la biomasa de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 70).

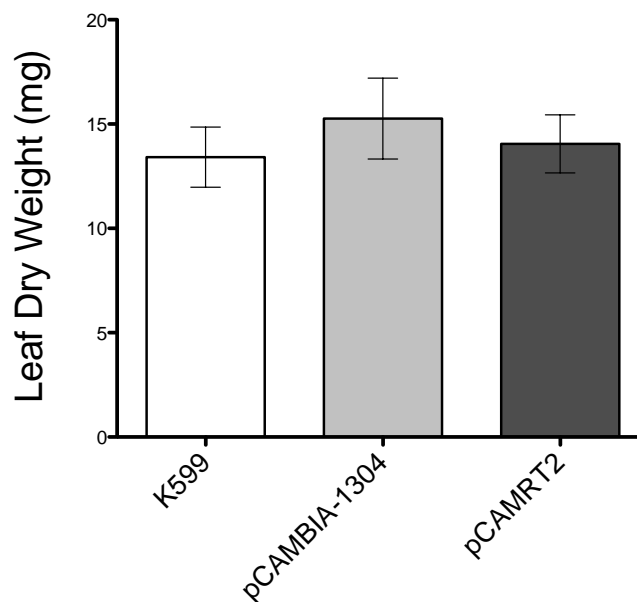


Figura 70. Peso seco o biomasa de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2. Los resultados del peso seco en las hojas de plantas compuestas de *P.*

vulgaris con nódulos transgénicos de pCAMRT2 corresponden a 3 plantas compuestas ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias del peso seco en hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas.

El contenido relativo de agua (RWC) de las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 se evaluó. En las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 se determinó un incremento del RWC de aproximadamente el 6% con respecto al registrado en las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos control (K599, pCAMBIA-1304) (Figura 71).

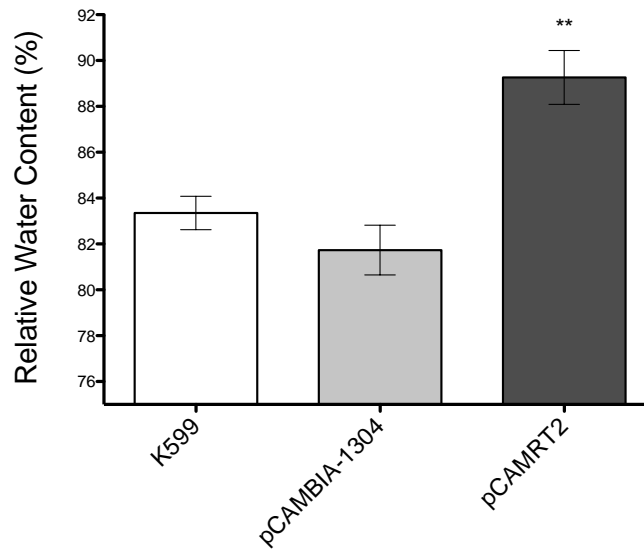


Figura 71. Contenido relativo de agua (RWC) de hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2. Los resultados de RWC en las hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 corresponden a 3 experimentos independientes ($n=3$), la determinación estadística de las diferencias de RWC en hojas de plantas compuestas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 fue mediante la prueba de *t* de Student a 2 colas (** $<P=0.01$).

DISCUSIÓN

PvTRE1-RNAi

En el genoma de *P. vulgaris* (Phytozome v8.0, Mazorka) se encontró la secuencia codificante para la trehalasa. La secuencia de amino ácidos se dedujo de la secuencia codificante para la trehalasa y se realizó el modelado y análisis de la estructura tridimensional tomando como base y punto de comparación la estructura cristalizada de la trehalasa de *E. coli* (EcTRE), y este análisis reveló un alto grado (0.080 Å) de conservación de la estructura tridimensional, y al realizar su análisis filogenético se agrupó con las trehalasas de origen vegetal, dando lugar a designar a la secuencia codificante de la trehalasa como *PvTRE1*; en conjunto el alto grado de conservación de la estructura tridimensional aunado al de la conservación de la secuencia y muy probable de la función entre las trehalasas de origen vegetal, así como se ha reportado para las trehalasas de invertebrados, hongos y de otros grupos filogenéticos (Doehlemaann *et al.*, 2006; Lunn, 2007; Silva *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). La estructura génica de *PvTRE1* consta en 10 exones y 9 intrones, muy similar a la estructura génica de *GmTRE1* y *MtTRE1*, ambos genes poseen 11 exones y 10 intrones, y a su vez la estructura génica de *AtTRE1* es muy distinta, ya que esta consta de 6 exones y 5 intrones (Figura 11). Además, en las raíces noduladas la expresión de *PvTRE1* está restringida principalmente en los nódulos, muy semejante a la expresión de los genes que codifican para las nodulinas, tales como *leghemoglobina A* y *sacarosa sintasa*. La expresión de *PvTRE1* restringida al nódulo (Figura 14) sugiere que *PvTRE1* podría participar en el metabolismo de carbono en los nódulos, así como también se ha sugerido anteriormente para su homólogo en soya (*GmTRE1*) (Aeschbacher *et al.*, 1999).

La acumulación de transcrito de *PvTRE1* en raíces fue inferior (5 veces) que la registrada en nódulos, pero permaneció constante a lo largo del desarrollo del nódulo. Además, se observó una relación inversa entre el perfil de acumulación de transcrito de *PvTRE1* y la concentración de trehalosa durante el desarrollo del nódulo, y que el mayor incremento en la acumulación de transcrito de *PvTRE1* coincide con el inicio de la senescencia del nódulo, al igual que en la senescencia de *Arabidopsis* se incrementa la expresión de *AtTRE1* (Fernandez *et al.*, 2010). También es interesante denotar que el perfil de la acumulación de transcrito de *PvSUS1* fue paralelo a la concentración de trehalosa durante el desarrollo del nódulo, y por ende opuesto a la acumulación de transcrito de *PvTRE1* (Figura 18). Esto da soporte a que *PvTRE1* podría regular el contenido de trehalosa en los nódulos, aunado al hecho de que la inhibición de la actividad de la trehalasa por la adición de validamicina A provoca un aumento en la acumulación de trehalosa (López *et al.*, 2009); y de que el contenido de trehalosa influye directamente en la expresión de *PvSUS1*, lo cual es consistente con un reporte previo en el cual la adición de trehalosa en raíces no noduladas de soya provoca la inducción de la actividad de la sacarosa sintasa, y la inhibición de la trehalasa mediante la adición de validamicina A da lugar a una reducción en el contenido de sacarosa (Müller *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1998).

El impacto de la trehalosa en la fisiología de los nódulos se evaluó mediante la disminución en los niveles de expresión de *PvTRE1* utilizando RNAi en plantas compuestas de *P. vulgaris*. La disminución de un 82% de la acumulación de transcrito de *PvTRE1* (Figura 19) al parecer tiene mayor repercusión en la acumulación de trehalosa (78%, Figura 25) que el obtenido por la inhibición de la actividad de la trehalasa mediante la adición de validamicina A en nódulos de soya, el cual provocó una inhibición del

73% de la actividad enzimática y el incremento sólo del 46% en el contenido de trehalosa (Müller *et al.*, 1995). Además del incremento en el contenido de trehalosa en los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi se incrementaron los niveles de expresión de genes involucrados directamente en el metabolismo de carbono y crecimiento (*PvSUS1*, *PvHXX1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*), y autofagia (*PvATG3*) (Figura 21), sugiriendo que este incremento de la expresión génica fue promovido por la disminución de la acumulación de transcrito de *PvTRE1*, lo que a su vez dio lugar al incremento en el contenido de trehalosa. El incremento en la acumulación de transcrito de *PvSUS1* (203%) y de *PvHXX1* (134%) sugieren el aumento en la asimilación de carbono, muy probablemente impulsado por un incremento en la tasa de la degradación de sacarosa en los nódulos, ya que no se determinó un cambio aparente en el contenido de glucosa y fructosa (Figura 25) (Müller *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2003). El incremento en la acumulación de transcrito de *PvTOR* (43%), *PvSnRK1* (81%) y de *PvATG3* (26%) (Figura 21), sugiere un impacto directo y positivo sobre la autofagia y el reciclamiento celular, ya que estos genes están activamente involucrados en la regulación del desarrollo celular y del recambio de proteínas. Se ha reportado que la trehalosa posee la capacidad de inducir a la autofagia por una vía independiente de TOR (trehalosa dependiente), sugiriendo a su vez que las células animales y las células vegetales poseen mecanismos similares para promover el reciclaje celular en lugar de activar la muerte celular programada (Sarkar *et al.*, 2007; Aguib *et al.*, 2009; Jossier *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Casarejos *et al.*, 2011; Hofius *et al.*, 2011).

La acumulación de trehalosa, mediada por la disminución en los niveles de expresión de *PvTRE1*, promovió la degradación de sacarosa, el incremento en la sobrevivencia bacteriana, incremento en la biomasa del nódulo, aumento en la fijación de nitrógeno e incremento en la acumulación de transcrito de *PvGOGAT* (Figuras 25-29). El incremento en la proliferación bacteriana en el interior de los nódulos podría ser dirigida por la acumulación de trehalosa y su probable translocación de las células infectadas hacia los *Rhizobium*. Los rhizobia poseen dos operón y dos genes involucrados directamente en la translocación y asimilación de trehalosa (*thuEFGK*, *aglEFGAK*, *thuA*, *thuB*), y que son inducidos principalmente por la presencia de trehalosa (Jensen *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005; Ampomah *et al.*, 2008; Schmeisser *et al.*, 2009), lo que sugiere que el metabolismo para el procesamiento de trehalosa en los bacteriodes podría estar activo. Además, el incremento del contenido de trehalosa en los nódulos no sólo promovió el incremento de la biomasa del nódulo, también tuvo un impacto positivo en la acumulación de trehalosa en las hojas. Esto sugiere un efecto a nivel sistémico de la acumulación de trehalosa en los nódulos, ya que la planta parcialmente está genéticamente modificada: sólo las raíces y los nódulos son transgénicos. El contenido de trehalosa en las hojas incrementó aproximadamente un 27%, sin detrimento alguno en el área foliar o el peso seco de la hoja (biomasa neta) (Figuras 32, 35 y 36). El incremento del contenido de trehalosa en las hojas podría deberse a la movilización de este disacárido desde los nódulos a las hojas, como se había reportado y sugerido previamente que ocurre en los granos de *P. vulgaris* inoculados con *Rhizobium* (Altamirano-Hernández *et al.*, 2007). Por lo tanto, esto podría sugerir la existencia de un transporte directo y bidireccional de disacáridos entre las hojas y los nódulos de *P. vulgaris* durante la simbiosis. Además, la acumulación de trehalosa por la disminución en los niveles de expresión de *PvTRE1* en los nódulos dio lugar al incremento en la proliferación de los bacteriodes (casi un orden de magnitud mayor), el incremento en la fijación de nitrógeno (70%) y el incremento en la biomasa del nódulo (3 veces). Es destacable que el incremento en la biomasa del nódulo y de la proliferación bacteriana en el mismo no tuvieron efectos negativos sobre el área foliar y la biomasa de las hojas. En las leguminosas súper-nodulantes se ha determinado

un impacto negativo sobre la parte aérea (biomasa y longitud reducidas). En estas leguminosas súper-nodulantes es interesante destacar que el incremento en el número de nódulos no da lugar a un incremento en la tasa de fijación de nitrógeno (Penmetsa *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2010). Por lo tanto, la disminución en los niveles de expresión de *PvTRE1* en los nódulos da lugar a un incremento en el consumo de carbono, lo cual se refleja directamente en la biomasa de los nódulos, y a su vez al incremento del contenido de trehalosa en los nódulos así como en las hojas. Es sabido que la trehalosa juega un papel central en la regulación del contenido de sacarosa en las células vegetales (Lunn, 2008; Paul, 2008; Schluepmann & Paul, 2009). Los resultados obtenidos en este proyecto sugieren que la trehalosa tiene la capacidad de inducir la expresión de *PvSUS1* para así llevar a cabo la degradación de la sacarosa, y por ende regular el contenido de sacarosa en las células vegetales (Müller *et al.*, 1998; Schluepmann *et al.*, 2003; Schluepmann *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006; Ramon & Rolland, 2007). En conjunto los datos sugieren que mediante la modificación del contenido de trehalosa en los nódulos es posible alterar el flujo metabólico de los carbohidratos, y a su vez cambiar la relación entre los órganos productores (fuente)-órganos consumidores (sumidero) de carbono (Schluepmann & Paul, 2009).

Los cambios en la cantidad de bacteroides y su morfología dentro de los nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi, incluyen la observación de una estructura que rodea a los bacteroides a la cual se le denominó “límite electro denso” (edb) (Figuras 22i y 23). Esta estructura podría estar constituida por carbohidratos tal como se reportó previamente para otra especie de *Rhizobium* (Fernandez-Aunión *et al.*, 2010). La modificación del contenido de trehalosa en los *Rhizobium* ya sea por la sobre-expresión o mutación de un gen de biosíntesis de trehalosa (*OtsA*) influye directamente en la distribución de las células infectadas en los nódulos, y promueve la inducción de la expresión de genes involucrados en la asimilación de nitrógeno y carbono, transporte de oxígeno, y detoxificación de especies reactivas de oxígeno tales como el peróxido de hidrógeno en *P. vulgaris* durante la interacción simbiótica, lo cual da lugar a una mejora en la producción de grano, fijación de nitrógeno y tolerancia a estrés abiótico (deseccación) (Suárez *et al.*, 2008). Estos resultados apoyan el hecho de que la modificación del contenido de trehalosa en los nódulos provoca alteraciones fisiológicas que dan lugar a un incremento en el metabolismo del carbono y del nitrógeno, así como un incremento en la sobrevivencia de los bacteroides y aumento en la fijación de nitrógeno, lo cual a su vez impacta positivamente a la interacción simbiótica.

***PvTPS6c2*-RNAi**

En el genoma de *P. vulgaris* (Phytozome v8.0, Mazorka) se encontraron las secuencias codificantes para las trehalosa-6-fosfato sintasas. Las cuales se agruparon en dos familias: las TPSs clase I (*PvTPS1c1-4c1*) y las TPSs clase II (*PvTPS1c2-7c2*) (Figura 41), presentando la misma distribución de integrantes que la observada en *Arabidopsis* (Leyman *et al.*, 2001; Lunn, 2007). De ambas familias génicas sólo se tienen reportes de expresión de *PvTPS6c2* (Ramírez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007). La secuencia de amino ácidos se dedujo de la secuencia codificante para *PvTPS6c2* y se realizó el modelado y análisis de la estructura tridimensional de los dominios sintasa y fosfatasa, tomando como base y punto de comparación la estructura cristalizada de la TPS de *E. coli* (EcOtsA) y la TPP de *T. acidophilum* (TaOtsB). Este análisis reveló un alto grado (0.084 Å, ambos casos) de conservación de la estructura tridimensional de los dominios TPS y TPP de *PvTPS6c2*. *PvTPS6c2* es homólogo AtTPS6 (isoformas larga y corta) de *Arabidopsis*, ya que agrupó en el mismo clado en el árbol filogenético

generado para las TPSs (Figura 41). En conjunto, el alto grado de conservación de la secuencia y de la estructura tridimensional entre las TPSs clase II de *Arabidopsis* y de PvTPS6c2 sugieren una conservación de la función (Chary *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011). La estructura génica de PvTPS6c2 consta en 2 exones y 1 intrón, al igual que PvTPS3c2 y PvTPS5c2, y a la estructura génica de PvTPS1c2, PvTPS2c2, PvTPS4c2 y PvTPS7c2 consiste en 3 exones y 2 intrones (Figura 40). En las raíces noduladas la expresión de PvTPS6c2 es mayoritaria en los nódulos, semejante a la expresión de los genes codificantes para nodulinas (Figura 42). Esto sugiere que PvTPS6c2 podría participar en el metabolismo de carbono en los nódulos, tal como se ha sugerido, a nivel sistémico, para las TPSs clase II de *Arabidopsis* (Ramon *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011). Los niveles de expresión de los integrantes de la familia de TPSs clase II son inferiores a los registrados para PvTPS6c2 (Figura 44), lo que sugiere que estos niveles de expresión no fueron suficientes para ser detectados en las librerías de ESTs reportadas previamente en nódulos de *P. vulgaris* (Melotto *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007).

El impacto de PvTPS6c2 en la fisiología de los nódulos se evaluó abatiendo los niveles de expresión de PvTPS6c2 mediante RNAi en plantas compuestas de *P. vulgaris*. El decremento resultante del 85% de la acumulación de transcrito de PvTPS6c2 (Figura 45) repercutió negativamente en la acumulación de trehalosa, dando lugar a una reducción del contenido de trehalosa en un 30% (Figura 48). La disminución de la acumulación de transcrito de PvTPS6c2 y del descenso en el contenido de trehalosa en los nódulos transgénicos de PvTPS6c2-RNAi al parecer dieron lugar a la modificación de los niveles de expresión de genes del metabolismo de carbono y crecimiento (incremento de PvSUS1, PvHXX1, PvSnRK1; reducción de PvTOR), y autofagia (incremento de PvATG3; reducción de PvBeclin) (Figura 46). El incremento en la acumulación de transcrito de PvSUS1 (145%), de PvHXX1 (99%), de PvSnRK1 (55%) y de PvATG3 (57%) sugieren el aumento en la asimilación de carbono y del reciclaje intracelular probablemente promovido por el incremento en la acumulación de transcrito de PvSnRK1, aunado al incremento de la acumulación de transcrito de PvATG3, y que no se determinó un cambio aparente en el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa lo que sugiere un posible incremento en el flujo y asimilación de estos; así como una posible función regulatoria de PvTPS6c2 sobre estos genes (Figura 46) (Moore *et al.*, 2003; Schluempmann *et al.*, 2003; Jossier *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). La reducción en la acumulación de transcrito de PvTOR (43%) y de PvBeclin (52%) (Figura 46), sugiere una regulación directa sobre el desarrollo celular (PvTOR) y la autofagia (PvBeclin); además de mostrar un efecto de regulación de la expresión directo sobre estos genes que no se había reportado previamente.

La disminución en los niveles de expresión de PvTPS6c2, afectó negativamente la acumulación de trehalosa, no tuvo efecto en la sobrevivencia bacteriana, la fijación de nitrógeno no presentó alteraciones, la acumulación de transcrito de PvGOGAT y PvGS no cambiaron, y se registró un incremento en la biomasa del nódulo y aumento en el tamaño de los bacteroides dentro de los mismos (Figuras 45, 47-52). El incremento en la biomasa del nódulo y el aumento del tamaño de los bacteroides podría ser un efecto directo del incremento de la asimilación de carbono tanto para el nódulo como para los bacteroides (aumento en los niveles de expresión de PvSUS1, PvHXX1 y PvSnRK1, Figura 46). Aunque, el aumento en el tamaño de los bacteroides no repercutió en la fijación de nitrógeno. En cambio, en las hojas se determinó una reducción en el contenido de trehalosa (30%), reducción en el área foliar (36%) y reducción en la biomasa foliar (36%). Esto sugiere un efecto a nivel

sistémico sobre la posible translocación de trehalosa desde los nódulos a las hojas (parte aérea), por el hecho de que son plantas de *P. vulgaris* compuestas: únicamente las raíces y los nódulos están genéticamente modificados (Figuras 54, 56 y 57). La reducción en el contenido de trehalosa (30%) en las hojas sugiere la movilización de este disacárido desde los nódulos a las hojas, como efecto directo de la reducción del contenido de trehalosa en los nódulos de *PvTPS6c2-RNAi*, reforzando la propuesta del flujo de este disacárido desde los nódulos a la parte aérea de la planta planteada previamente (Altamirano-Hernández *et al.*, 2007). Es interesante destacar que en las plantas compuestas con nódulos transgénicos de *PvTPS6c2-RNAi* se registre reducción en área foliar, biomasa foliar, los nódulos hayan experimentado un incremento significativo (4 veces) y aumento en el tamaño de los bacteroides en el interior de los mismos, sin incremento en la capacidad de fijación de nitrógeno, lo que asemeja un efecto similar observado en las plantas leguminosas que son súper-ondulantes en donde el incremento en la cantidad de nódulos (5-6 veces más) afecta negativamente la parte aérea de la planta (reducción en longitud del tallo y del área foliar) y la capacidad de fijación de nitrógeno no se incrementa (Penmetsa & Cook, 1997; Penmetsa *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2010).

pCAMRT2

La TPS heteróloga de *R. etli* fusionada a GFP (*ReTPS::GFP*) presentó una distribución predominante en la zona central de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 (Figuras 58 y 59). La presencia de *ReTPS::GFP* no afecta la colonización de las células infectadas por *Rhizobium*, tal como lo indican las micrografías de microscopía óptica de los cortes transversales de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 en donde se observan las células infectadas con bacteroides de *Rhizobium* en su interior (Figuras 59 y 60). El contenido de trehalosa incrementó un 50% (Figura 61), lo que indica un incremento en la producción de T6P (intermediario de la biosíntesis de trehalosa) y por ende fue una manera indirecta de corroborar la apropiada función de *ReTPS::GFP*. Al analizar las imágenes de CLSM y realizar el re-aislamiento de *Rhizobium* de los nódulos transgénicos de pCAMRT2 se determinó, en ambos casos, un efecto negativo sobre la viabilidad de los *Rhizobium* en los mismos, lo que sugiere que la expresión de heteróloga de *ReTPS::GFP* y el subsecuente incremento de la producción del precursor de trehalosa, T6P, influyen negativamente en la viabilidad de los *Rhizobium* al interior del nódulo (Figura 62). La T6P tiene efectos negativos y de regulación sobre la estabilidad estructural y funcional de las enzimas (Colaço *et al.*, 1992; Newman *et al.*, 1993; Singer & Lindquist, 1998a; Singer & Lindquist, 1998b; Schlupepmann *et al.*, 2003; Schlupepmann *et al.*, 2004; Kolbe *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). La disminución de la viabilidad de los bacteroides también repercutió en la capacidad de fijación de nitrógeno, ya que se registró un descenso significativo (20%) en la misma (Figura 66). Esto contrasta con los resultados obtenidos al inocular a *P. vulgaris* con *R. etli* que sobre-expresa a este gen (*ReTPS/ReOtsA*), en donde la fijación de nitrógeno incremento significativamente (38%) (Suárez *et al.*, 2008).

El incremento en el contenido de trehalosa promovido directamente por el incremento en la producción de su intermediario de biosíntesis, T6P, en los nódulos transgénicos de pCAMRT2 dio lugar a evaluar sus efectos sobre genes del metabolismo del carbono y crecimiento (*PvSUS1*, *PvHXK1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*), de autofagia (*PvATG3*, *PvBeclin*) y de asimilación de nitrógeno (*PvGOGAT*, *PvGS*). Los niveles de expresión de *PvSUS1* se incrementaron (56%), aunque podría deberse más el incremento en el contenido de trehalosa que en si al incremento en la producción de T6P por *ReTPS::GFP*; la

reducción en los niveles de expresión de *PvTOR* (31%), *PvSnRK1* (31%) y *PvBeclin* (42%); y el efecto neutro sobre *PvHXX1*, *PvATG3*, *PvGOGAT* y *PvGS* sugieren una regulación negativa de la muerte celular sin afectar el crecimiento celular (Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006; Baena-González *et al.*, 2007; Jossier *et al.*, 2009).

Es interesante el comportamiento de los integrantes de la familia de las TPSs clase II en los nódulos transgénicos de pCAMRT2. En general (a excepción de *PvTPS1c2*) mostraron una reducción en sus niveles de expresión (Figura 64), tal como se ha reportado para otras TPSs clase II al sobre-expresar una TPS heteróloga (Schluepmann *et al.*, 2004; Debast *et al.*, 2011). Esto indica que T6P juega un rol en la regulación negativa de los genes de síntesis de trehalosa, y por ende en la regulación del metabolismo de trehalosa.

Además, el incremento del área foliar (34%) y el incremento del contenido relativo (6%) de las hojas de las plantas de *P. vulgaris* con nódulos transgénicos de pCAMRT2 sugiere un efecto a nivel sistémico por el cambio de la relación T6P/trehalosa en los nódulos, más que por el transporte de trehalosa de los nódulos a las hojas, ya que no se registró alteración en el contenido de trehalosa, u otros azúcares, en las hojas (Figura 68). Sin embargo, esto no descarta que el cambio en la relación T6P/trehalosa en los nódulos y el impacto sobre el área foliar y el contenido relativo de agua en las hojas, que no están genéticamente modificadas, sea un efecto de alterar la distribución/disponibilidad de carbono a nivel sistémico (Schluepmann *et al.*, 2003; Altamirano-Hernández *et al.*, 2007; Schluepmann & Paul, 2009).

CONCLUSIÓN

En el genoma de frijol se pudo identificar la presencia de los genes del metabolismo de trehalosa, los cuales se agruparon en las familias génicas de las TPSs clase I (cuatro integrantes), las TPSs clase II (siete integrantes), la familia de las TPPs (dos integrantes) y sólo un gen para la trehalasa. En las bases de datos de las secuencias expresadas etiquetadas (ESTs o de transcriptómica) durante la interacción simbiótica, precisamente en el nódulo maduro, se identificaron transcritos correspondientes a la trehalasa (*PvTRE1*) y a un integrante de la familia de TPSs clase II (*PvTPS6c2*). La utilización de ARN interferente para *PvTRE1* y *PvTPS6c2* dio lugar a la disminución de la acumulación de transcrito en ambos casos, y al incremento y disminución del contenido de trehalosa, respectivamente, en los nódulos transgénicos de frijol. Por ende, el estudio de la alteración del contenido de trehalosa en los nódulos de frijol es importante, desde el punto de vista de que el metabolismo de trehalosa desempeña una función central en la regulación del contenido y distribución de los carbohidratos solubles en la célula vegetal (Paul & Pellny, 2003; Pellny *et al.*, 2004; Lunn *et al.*, 2006; Lunn, 2008; Paul *et al.*, 2008; Schluemann & Paul, 2009). En conjunto, todos los datos sugieren que la modificación del contenido de trehalosa en los nódulos provoca alteraciones en el flujo metabólico del carbono, y como consecuencia cambiando la relación fuente-sumidero de los órganos fijadores de carbono/nitrógeno y consumidores de estos (Schluemann & Paul, 2009). Por lo tanto, la modificación del metabolismo de trehalosa y el contenido de la misma en los nódulos da lugar a alteraciones fisiológicas para modular el metabolismo de carbono y nitrógeno, así como influir directamente en la viabilidad y proliferación de los bacteroides y su capacidad de fijación de nitrógeno, lo que a su vez da lugar a la regulación e influencia directa sobre la interacción simbiótica.

PERSPECTIVAS

- Analizar posibles mecanismos de regulación de la acumulación de los transcritos de genes de la síntesis y la degradación de trehalosa en *P. vulgaris*.
- Sería necesario realizar la estandarización de la tolerancia a estrés hídrico y calórico de las plantas compuestas con nódulos transgénicos con nódulos transgénicos de *PvTRE1*-RNAi y pCAMRT2.
- Se propone la modificación del metabolismo de trehalosa para su uso en variedades de *P. vulgaris* cultivables.
- La generación de variedades en donde la acumulación de trehalosa, mediante la disminución de los niveles de expresión de *PvTRE1*, podrían representar una opción viable para mejorar la fijación del nitrógeno.

Bibliografía

- Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A. 1999.** Purification of the Trehalase GMTRE1 from Soybean Nodules and Cloning of Its cDNA. *GMTRE1 Is Expressed at a Low Level in Multiple Tissues. Plant Physiology* **119**: 489-495.
- Aguib Y, Heiseke A, Gilch S, Riemer C, Baier M, Schätzl H, Ertmer A. 2009.** Autophagy Induction by Trehalose Counteracts Cellular Prion Infection. *Autophagy* **5**(3): 1-9.
- Almeida AM, Santos M, Villalobos E, Araújo SS, Van Dijck P, Leyman B, Cardoso LA, Santos D, Fevereiro PS, Torné JM. 2007.** Immunogold Localization of Trehalose-6-Phosphate Synthase in Leaf Segments of Wild-Type and Transgenic Tobacco Plants Expressing the *AtTPSI* Gene from *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* **230**: 41-49.
- Altamirano-Hernández J, López MG, Acosta-Gallegos JA, Farías-Rodríguez R, Peña-Cabriales JJ. 2007.** Influence of soluble sugars on seed quality in nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): The case of trehalose. *Crop Science* **47**: 1193-1205.
- Ampomah OY, Jensen JB, Bhuvaneshwari TV. 2008.** Lack of trehalose catabolism in *Sinorhizobium* species increases their nodulation competitiveness on certain host genotypes. *New Phytologist* **179**: 495-504.
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein JM, Iturriaga G. 2004.** The *Arabidopsis* Trehalose-6-P Synthase *AtTPSI* Gene is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. *Plant Physiology* **136**: 3649-3659.
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G. 2006.** Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 109.
- Bae H, Herman E, Bailey B, Bae H-J, Sicher R. 2005.** Exogenous Trehalose Alters *Arabidopsis* Transcripts Involved in Cell Wall Modification, Abiotic Stress, Nitrogen Metabolism and Plant Defense. *Physiologia Plantarum* **125**: 114-126.
- Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. 2007.** A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938-943.
- Baena-González E, Sheen J. 2008.** Convergent energy and stress signaling. *TRENDS in Plant Science* **13**(9): 474-482.
- Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. 2001.** Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *The Journal of Biological Chemistry* **276**(26): 24261-24267.
- Blázquez MA, Santos E, Flores C-L, Martínez-Zapater JM, Salinas j, Gancedo C. 1998.** Isolation and Molecular Characterization of the *ArabidopsisTPSI* Gene, Encoding Trehalose-6-Phosphate Synthase. *The Plant Journal* **13**(5): 685-689.

- Brechenmacher L, Lei Z, Libault M, Findley S, Sugawara M, Sadowsky MJ, Sumner LW, Stacey G. 2010.** Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology* **153**: 1808-1822.
- Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L, Schmülling T. 2005.** Immediate-early and Delayed cytokinin Response Genes of *Arabidopsis thaliana* Identified by Genome-wide Expression Profiling Reveal Novel Cytokinin-sensitive Processes and Suggest Cytokinin Action Through Transcriptional Cascades. *The Plant Journal* **44**: 314-333.
- Brodmann D, Schuller A, Ludwig-Müller J, Aeschbacher RA, Wiemken A, Boller T, Wingler A. 2002.** Induction of Trehalase in *Arabidopsis* Plants Infected with the Trehalose-Producing Pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular Plant-Microbe Interact* **15**(7): 693-700.
- Burroughs AM, Allen KN, Dunaway-Mariano D, Aravind L. 2006.** Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes. *Journal of Molecular Biology* **361**(5): 1003-1034.
- Cabib E, LeLoir LF. 1958.** The Biosynthesis of Trehalose Phosphate. *The Journal of Biological Chemistry* **231**(1): 259-275.
- Calvert H, Pence MK, Pierce M, Malik NSA, Bauer WD. 1984.** Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infection in soybean roots. *Canadian Journal of Botany* **62**: 2375-2384.
- Casarejos MJ, Solano RM, Gómez A, Perucho J, de Yébenes JG, Mena MA. 2011.** The Accumulation of Neurotoxic Proteins, Induced by Proteasome Inhibition, is Reverted by Trehalose, an Enhancer of Autophagy, in Human Neuroblastoma Cells. *Neurochemistry International* **58**(4): 512-520.
- Chary SN, Hicks GR, Choi YG, Carter D, Raikhel NV. 2008.** Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase regulates cell shape and plant architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**: 97-107.
- Chen J, Tang B, Chen H, Yao Q, Huang X, Chen J, Zhang D, Zhang W. 2010.** Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE* **5**(4): e10133.
- Colaço C, Sen S, Thangavelu M, Pinder S, Roser B. 1992.** Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology. *Biotechnology (N Y)* **10**(9): 1007-1011.
- Cytryn EJ, Sangurdekar DP, Streeter JG, Franck WL, Chang W-S, Stacey G, Emerich DW, Joshi T, Xu D, Sadowsky MJ. 2007.** Transcriptional and Physiological Responses of *Bradyrhizobium japonicum* to Desiccation-Induced Stress. *Journal of Bacteriology*. **189**(19): 6751-6762.
- Debast S, Nunes-Nesi A, Hajirezaei M-R, Hofmann J, Sonnewald U, Fernie AR, Börnke F. 2011.** Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiology* **156**: 1754-1771.

- DeLano WL. 2002.** The PyMol Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, USA.
- Ding Y, Oldroyd GED. 2009.** Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signaling and Behavior* **4**(2): 89-93.
- Doehlemann G, Berndt P, Hahn M. 2006.** Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* **152**: 2625-2634.
- Eastmond PJ, Van Dijken A, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JDG, Smeekens S, Graham IA. 2002.** Trehalose-6-Phosphate Synthase 1, Which Catalyses the First Step in Trehalose Synthesis, is Essential for *Arabidopsis* Embryo Maturation. *The Plant Journal* **29**(2): 225-235.
- Elbein AD, Pan YT, Pastuzak I, Carroll D. 2003.** New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**(4): 17R-27R.
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares J-E, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sánchez F. 2007.** Fast, Efficient and Reproducible Genetic Transformation of *Phaseolus* spp. By *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* **2**(7): 1819-1824.
- FAOSTAT AD. 2010.** Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farías-Rodríguez R, Mellor RB, Arias C, Peña-Cabriales JJ. 1998.** The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiologia Plantarum* **102**: 353-359.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff PM. 2010.** Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**(1): 61-76.
- Fernandez O, Béthencourt L, Quero A, Sangwan RS, Clément C. 2010.** Trehalose and plant stress responses: Friend or foe? *TRENDS in Plant Science* **15**(7): 409-417.
- Fernandez-Aunión C, Hamouda TB, Iglesias-Guerra F, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Aouani ME, Vargas C. 2010.** Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiology* **10**: 192.
- Fougère F, Le Rudulier D, Streeter JG. 1991.** Effects of Salt Stress on Amino Acid, Organic Acid, and Carbohydrate Composition of Roots, Bacteroids, and Cytosol of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* **96**: 1228-1236.
- Frison M, Parrou JL, Guillaumot D, Masquelier D, François J, Chaumont F, Batoko H. 2007.** The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *FEBS Letters* **581**: 4010-4016.
- Gage DJ. 2004.** Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**(2): 280-300.

- Garg AK, Kim J-K, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ. 2002.** Trehalose Accumulation in Rice Plants Confers High Tolerance Levels to Different Abiotic Stresses. *Proceedings of National Academy of Science, USA* **99**(25): 15898-15903.
- Ge L-F, Chao D-Y, Shi M, Zhu M-Z, Gao J-P, Lin H-X. 2008.** Overexpression of the Trehalose-6-phosphate Phosphatase Gene *OsTPPI* Confers Stress Tolerance in Rice and Results in the Activation of Stress Responsive Genes. *Planta*.
- Gibson RP, Gloster TM, Roberts S, Warren RAJ, Storch de Gracia I, García Á, Chiara JL, Davies GJ. 2007.** Molecular Basis for Trehalase Inhibition Revealed by the Structure of Trehalase In Complex with Potent Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **46**(22): 4115-4119.
- Gibson RP, Tarling CA, Roberts S, Withers SG, Davies GJ. 2004.** The Donor Subsite of Trehalose-6-Phosphate Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **279**(3): 1950-1955.
- Gibson RP, Turkenburg JP, Charnock SJ, Lloyd R, Davies GJ. 2002.** Insights into Trehalose Synthesis Provided by the Structure of the Retaining Glucosyltransferase OtsA. *Chemistry & Biology* **9**: 1337-1346.
- Glinski M, Weckwerth W. 2005.** Differential Multisite Phosphorylation of the Trehalose-6-Phosphate Synthase Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**(10): 1614-1625.
- Goddijn O, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RWHH, de Graaf PTHM, Poels J, Van Dun K, Ponstein AS, Damm B, Pen J. 1997.** Inhibition of Trehalase Activity Enhances Trehalose Accumulation in Transgenic Plants. *Plant Physiology* **113**: 181-190.
- Gómez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, Graham IA. 2006.** Delayed embryo development in the *ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1* Mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *The Plant Journal* **46**: 69-84.
- González V, Santamaría RI, Bustos P, Hernández-González I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga SC, Ramírez MA, Jiménez-Jacinto V, Collado-Vides J, Dávila G. 2006.** The Partitioned *Rhizobium etli* Genome: Genetic and Metabolic Redundancy in Seven Interacting Replicons. *Proceedings of National Academy of Science, USA* **103**(10): 3834-3839.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA. 2000.** Orchestrated Transcription of Key Pathways in Arabidopsis by the Circadian Clock. *Science* **290**(5499): 2110-2113.
- Harthill JE, Meek SEM, Morrice N, Peggie MW, Borch J, Wong BHC, MacKintosh C. 2006.** Phosphorylation and 14-3-3 Binding of Arabidopsis Trehalose-phosphate Synthase 5 in Response to 2-Deoxyglucose. *The Plant Journal* **47**: 211-223.
- Heidstra R, Yang W, Yalcin Y, Peck S, Emons AM, Van Kammen A, Bisseling T. 1997.** Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. *Development* **124**: 1781-1787.

- Hernández G, Ramírez M, Valdés-López O, Tesfaye M, Graham MA, Czechowski T, Schlereth A, Wandrey M, Erban A, Cheung F, Wu HC, Lara M, Town CD, Kopka J, Udvardi MK, Vance CP. 2007.** Phosphorus stress in common bean: Root transcript and metabolic responses. *Plant Physiology* **144**: 752-767.
- Higashiyama T. 2002.** Novel Functions and Applications of Trehalose. *Pure Applied Chemistry* **74**(7): 1263-1269.
- Hofius D, Munch D, Bressendorff S, Mundy J, Petersen M. 2011.** Role of autophagy in disease resistance and hypersensitive response-associated cell death. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1257-1262.
- Holmstrom K-O, Mantyla E, Wellin B, Mandal A. 1996.** Drought Tolerance in Tobacco. *Nature* **379**: 683-684.
- Jefferson RA, Kavanagh T, A., Bevan MW. 1987.** GUS Fusions: β -Glucuronidase As a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants. *The EMBO Journal* **6**(13): 3901-3907.
- Jensen JB, Ampomah OY, Darrah R, Peters NK, Bhuvanewari TV. 2005.** Role of trehalose transport and utilization in *Sinorhizobium meliloti*--alfalfa interactions. *Molecular Plant-Microbe Interact* **18**(7): 694-702.
- Jensen JB, Peters NK, Bhuvanewari TV. 2002.** Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. **184**(11): 2978-2986.
- Jossier M, Bouly J-P, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Hardie DG, Thomas M. 2009.** SnRK1 (SNF1-related Kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **59**: 316-328.
- Kaasen I, McDougall J, Strøm AR. 1994.** Analysis of the *otsBA* Operon For Osmoregulatory Trehalose Synthesis in *Escherichia coli* and Homology of the OtsA and OtsB proteins to the Yeast Trehalose-6-phosphate Synthase/Phosphatase Complex. *Gene* **145**(1): 9-15.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S. 2000.** Complete Genome Structure of the Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Research* **7**: 331-338.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S. 2002.** Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research* **9**: 189-197.
- Karim S, Aronsson H, Erickson H, Pirhonen M, Leyman B, Welin B, Mäntylä E, Palva ET, Van Dijck P, Holmstrom K-O. 2007.** Improved Drought Tolerance Without Undesired Side Effects in Transgenic Plants Producing Trehalose. *Plant Molecular Biology* **64**: 371-386.

- Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Hilson P. 2007.** Building Blocks for Plant Gene Assembly. *Plant Physiology* **145**: 1183-1191.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul MJ, Ulrich S, Geigenberger P. 2005.** Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of National Academy of Science, USA* **102**(31): 11118-11123.
- Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M. 2010.** How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbiosis underground. *Plant Cell Physiology* **51**(9): 1381-1397.
- Langenkämper G, Fung RWM, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC, MacRae EA. 2002.** Sucrose Phosphate Synthase Genes In Plants Belongs To Three Different Families. *Journal of Molecular Evolution* **54**: 322-332.
- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein JM. 2001.** An Unexpected Plethora of Trehalose Biosynthesis Genes in *Arabidopsis thaliana*. *TRENDS in Plant Science* **6**(11): 510-513.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lohar D, Stiller J, Kam J, Stacey G, Gresshoff PM. 2009.** Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Annals of Botany* **104**: 277-285.
- López M, Herrera-Cervera JA, Iribarne C, Tejera NA, Lluch C. 2008.** Growth and Nitrogen Fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* Under NaCl Stress: Nodule Carbon Metabolism. *Journal of Plant Physiology*. **165**: 641-650.
- López M, Tejera NA, Lluch C. 2009.** Validamycin A improves the response of *Medicago truncatula* plants to salt stress by inducing trehalose accumulation in the root nodules. *Journal of Plant Physiology*. **166**: 1218-1222.
- Lunn JE. 2007.** Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Functional Plant Biology* **34**: 550-563.
- Lunn JE 2008.** Sucrose metabolism. *eLS*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- .
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible W-R, Carillo P, Hajirezaei M-R, Stitt M. 2006.** Sugar-induced increases in trehalose-6-phosphate are correlated with redox activation of ADPGlucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **397**: 139-148.
- Mathews A, Carroll BJ, Gresshoff PM. 1989.** Development of *Bradyrhizobium* infection in supernodulating and non-nodulating mutants of soybean (*Glycine max* [L.] Merril. *Protoplasma* **150**: 40-47.

- McIntyre HJ, Davies H, Hore TA, Miller SH, Dufour J-P, Ronson CW. 2007.** Trehalose Biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and Its Role in Desiccation Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(12): 3984-3992.
- Melotto M, Monteiro-Vitorello CB, Bruschi AG, Camargo LEA. 2005.** Comparative bioinformatic analysis of genes expressed in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Genome* **48**: 562-570.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Chen W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003.** Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336.
- Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill JE, Morrice N, Meek SEM, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C. 1999.** Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *The Plant Journal* **18**(1): 1-12.
- Müller J, Aeschbacher RA, Wingler A, Boller T, Wiemken A. 2001a.** Trehalose and Trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **125**: 1086-1093.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 1995.** Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* **197**(2): 362-368.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 1998.** Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *Journal of Plant Physiology*. **153**: 255-257.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 2001b.** Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *Journal of Experimental Botany* **52**(358): 943-947.
- Müller J, Xie Z-P, Staehelin C, Mellor RB, Boller T, Wiemken A. 1994.** Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes. *Physiologia Plantarum* **90**: 86-92.
- Newman YM, Ring SG, Colaço C. 1993.** The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **11**: 263-294.
- Oldroyd GED, Downie JA. 2004.** Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Molecular Cell Biology* **5**: 566-576.
- Oldroyd GED, Harrison MJ, Paszkowski U. 2009.** Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* **324**: 753-.
- Osuna D, Usadel B, Morcuende R, Gibon Y, Bläsing OE, Höhne M, Günter M, Kamlage B, Trethewey R, Scheible W-R, Stitt M. 2007.** Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **49**: 463-491.
- Paul MJ. 2008.** Trehalose 6-phosphate: A signal of sucrose status. *Biochemical Journal* **412**: e1-e2.

- Paul MJ, Jhurrea D, Zhang Y, Primavesi LF, Delatte TL, Schluepmann H, Wingler A. 2010.** Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. *Plant Signaling and Behavior* **5**(4): 386-392.
- Paul MJ, Pellny TK. 2003.** Carbon Metabolite Feedback Regulation of Leaf Photosynthesis and Plant Development. *Journal of Experimental Botany* **54**(382): 539-547.
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y. 2008.** Trehalose Metabolism and Signaling. *The Annual Review of Plant Biology* **59**: 417-441.
- Pellny TK, Ghannoum O, Conroy JP, Schluepmann H, Smeekens S, Andralojc J, Krause KP, Goddijn O, Paul MJ. 2004.** Genetic Modification of Photosynthesis with *E. coli* genes for Trehalose Synthesis. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 71-82.
- Penmetsa RV, Cook DR. 1997.** A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* **275**: 527-530.
- Penmetsa RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR, Cook DR. 2003.** Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **131**: 998-1008.
- Pontius JU, Wagner L, Schuler GD 2003.** UniGene: An unified view of the transcriptome. In: J. M, J. O eds. *The NCBI handbook*. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information (USA), 1-11.
- Popp C, Ott T. 2011.** Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 458-467.
- Qu Q, Lee S-J, Boos W. 2004.** TreT, a Novel Trehalose Glycosyltransferring Synthase of the Hyperthermophilic Archeon *Thermococcus litoralis*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**(46): 47890-47897.
- Ramírez M, Graham MA, Blanco-López L, Silvente S, Medrano-Soto A, Blair MW, Hernández G, Vance CP, Lara M. 2005.** Sequencing and Analysis of Common Bean ESTs. Building a Foundation for Functional Genomics. *Plant Physiology* **137**: 1211-1227.
- Ramon M, De Smet I, Vandesteene L, Naudts M, Leyman B, Van Dijck P, Rolland F, Beeckman T, Thevelein JM. 2009.** Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **32**: 1015-1032.
- Ramon M, Rolland F. 2007.** Plant development: Introducing trehalose metabolism. *TRENDS in Plant Science* **12**(5): 185-188.
- Ramon M, Rolland F, Thevelein JM, Van Dijck P, Leyman B. 2007.** ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Molecular Biology* **63**: 195-206.
- Rao KN, Kumaran D, Seetharaman J, Bonanno JB, Burley SK, Swaminathan S. 2006.** Crystal Structure of Trehalose-6-phosphate Phosphatase-related Protein: Biochemical and Biological Implications. *Protein Science* **15**: 1735-1744.

- Rolland F, Baena-González E, Sheen J. 2006.** Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Reviews of Plant Biology* **57**: 675-709.
- Romero C, Bellés JM, Vayá JL, Serrano R, Culiáñez-Macià FA. 1997.** Expression of the Yeast *Trehalose-6-Phosphate Synthase* Gene in Transgenic Tobacco Plants: Pleiotropic Phenotypes Include Drought Tolerance. *Planta* **201**: 293-297.
- Ryu S-I, Park C-S, Cha J, Woo E-J, Lee S-B. 2005.** A Novel Trehalose-synthesizing Glycosyltransferase From *Pyrococcus horikoshii*: Molecular Cloning and Characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **329**: 429-436.
- Salminen SO, Streeter JG. 1986.** Enzymes of α,α -trehalose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiology* **81**: 538-541.
- Salminen SO, Streeter JG. 1992.** Labeling of Carbon Pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Bacteroids following Incubation of Intact Nodules with $^{14}\text{CO}_2$. *Plant Physiology* **100**: 597-604.
- Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. 2007.** Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant Huntingtin and α -Synuclein. *The Journal of Biological Chemistry* **282**(8): 5641-5652.
- Satoh-Nagasawa N, Nagasawa N, Malcomber S, Sakai H, Jackson D. 2006.** A Trehalose Metabolic Enzyme Controls Inflorescence Architecture in Maize. *Nature* **441**: 227-230.
- Schiraldi C, Di Lernia I, De Rosa M. 2002.** Trehalose Production: Exploiting Novel Approaches. *Trends in Biotechnology* **20**(10): 420-425.
- Schluepmann H, Paul M 2009.** Trehalose metabolites in *Arabidopsis*—elusive, active and central. In: Last R, Chang C, Jander G, Kliebenstein D, McClung R, Millar H, Torii K, Wagner D eds. *The Arabidopsis Book*. Washington, DC.: American Society of Plant Biologists, 1-17.
- Schluepmann H, Pellny TK, Van Dijken A, Smeekens S, Paul MJ. 2003.** Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Science, USA* **100**(11): 6849-6854.
- Schluepmann H, Van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul MJ, Smeekens S. 2004.** Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology* **135**: 879-890.
- Schmeisser C, Liesegang H, Krysciak D, Bakkou N, Le Quéré A, Wollherr A, Heinemeyer I, Morgenstern B, Pommerening-Röser A, Flores M, Palacios R, Brenner S, Gottschalk G, Schmitz RA, Broughton WJ, Perret X, Strittmatter AW, Streit WR. 2009.** *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(12): 4035-4045.
- Schnabel E, Mukherjee A, Smith LS, Kassaw T, Long SR, Frugoli JA. 2010.** The *lss* supernodulation mutant of *Medicago truncatula* reduces expression of the *SUNN* gene. *Plant Physiology* **154**: 1390-1402.

- Scott P, Lange AJ, Kruger NJ. 2000.** Photosynthetic Carbon Metabolism in Leaves of Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Containing Decreased Amounts of Fructose-2,6-bisphosphate. *Planta* **211**: 864-873.
- Shima S, Matsui H, Tahara S, Imai R. 2007.** Biochemical Characterization of Rice Trehalose-6-phosphata Phosphatases Supports Distinctive Functions of These Plant Enzymes. *FEBS Journal* **274**: 1192-1201.
- Silva MCP, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C. 2009.** Sequencing of *Spodoptera frugiperda* midgut trehalases and demonstration of secretion of soluble trehalase by midgut columnar cells. *Insect Molecular Biology* **18**(6): 769-784.
- Silvente S, Blanco-López L, Camas A, Ortega J-L, Ramírez M, Lara M. 2002.** *Rhizobium etli* mutant modulates carbon and nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**(7): 728-733.
- Singer MA, Lindquist S. 1998a.** Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cell* **1**: 639-648.
- Singer MA, Lindquist S. 1998b.** Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The yin and yang of trehalose. *Trends in Biotechnology* **16**(11): 460-468.
- Singh V, Louis J, Ayre BG, Reese JC, Shah J. 2011.** Trehalose phosphate synthase11-dependent trehalose metabolism promotes *Arabidopsis thaliana* defence against the phloem-feeding insect, *Myzus persicae*. *The Plant Journal*.
- Streeter JG. 1985.** Accumulation of α,α -trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *Journal of Bacteriology*. **164**(1): 78-84.
- Streeter JG. 1987.** Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiology* **85**: 768-773.
- Streeter JG, Bhagwat A. 1999.** Biosynthesis of Trehalose From Maltooligosaccharides in Rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology* **45**(8): 716-721.
- Streeter JG, Gomez ML. 2006.** Three Enzymes for Trehalose Synthesis in *Bradyrhizobium* Cultured Bacteria and in Bacteroids from Soybean Nodules. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4250-4255.
- Suárez R, Wong A, Ramírez M, Barraza A, Orozco MdC, Cevallos MA, Lara M, Hernández G, Iturriaga G. 2008.** Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**(7): 958-966.
- Sugawara M, Cytryn EJ, Sadowsky MJ. 2010.** Functional Role of *Bradyrhizobium japonicum* Trehalose Biosynthesis and Metabolism Genes During Physiological Stress and Nodulation. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(4): 1071-1081.

- Suzuki N, Bajad S, Shuman J, shulaev V, Mittler R. 2008.** The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **283**(14): 9269-9275.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Likelihood, Distance, and Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tejera Garcia NA, Iribarne C, López M, Herrera-Cervera JA, Lluch C. 2005.** Physiological Implications of Trehalase from *Phaseolus vulgaris* Root Nodules: Partial Purification and Characterization. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 355-361.
- Thevelein JM, Hohmann S. 1995.** Trehalose Synthase: Guard to the Gate of Glycolysis in Yeast. *Trends in Biotechnology* **20**: 3-10.
- Trevanion SJ. 2002.** Regulation of Sucrose and Starch Synthesis in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves: Role of Fructose-2,6-bisphosphate. *Planta* **215**: 653-655.
- Udvardi MK, Day D. 1997.** Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 493-523.
- Valdés-López O, Arenas-Huertero C, Ramírez M, Girard L, Sánchez F, Vance CP, Reyes JL, Hernández G. 2008.** Essential Role of MYB Transcription Factor: PvPHR1 and MicroRNA: PvmiR399 in Phosphorus-Deficiency Signalling in Common Bean Roots. *Plant, Cell and Environment* **31**(12): 1834-1843.
- Van Dijck P, Mascorro-Gallardo JO, De Bus M, Royackers K, Iturriaga G, Thevelein JM. 2002.** Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* Trehalose-6-phosphate Synthase Unlocks High Catalytic Activity and Supports High Trehalose Levels On Expression in Yeast. *Biochemical Journal* **366**: 63-71.
- Van Dijken A, Schlupepmann H, Smeekens S. 2004.** *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiology* **135**: 969-977.
- Van Schaftingen E, Hue L, Hers H-G. 1980.** Fructose-2,6-bisphosphate, the Probable Structure of the glucose- and glucagon-sensitive Stimulator of Phosphofruktokinase. *Biochemical Journal* **192**: 897-901.
- Vandesteene L, Ramon M, Le Roy K, Van Dijck P, Rolland F. 2010.** A Single Active Trehalose-6-P Synthase (TPS) and a Family of Putative Regulatory TPS-Like Proteins in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **3**(2): 406-419.
- Vauclare P, Bligny R, Gout E, De Meuron V, Widmer F. 2010.** Metabolic and structural rearrangement during dark-induced autophagy in soybean (*Glycine max* L.) nodules: An electron microscopy and 31P and 13C nuclear magnetic resonance study. *Planta* **231**(6): 1495-1504.

- Vessey JK. 1994.** Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defence of the acetylene reduction assay. *Plant Soil* **158**: 151-162.
- Vogel G, Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A. 1998.** Trehalose-6-phosphate Phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: Identification by Functional Complementation of the Yeast *tps2* Mutant. *The Plant Journal* **13**(5): 673-683.
- Wang X, Fan H, Ying Z, Li B, Wang H, Wang G. 2009.** Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neuroscience Letters* **469**: 112-116.
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Smeekens S. 2004.** A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translocation. *Plant Cell* **16**: 1717-1729.
- Wilson RA, Jenkinson JM, Gibson RP, Littlechild JA, Wang Z-Y, Talbot NJ. 2007.** Tps1 Regulates the Pentose Phosphate Pathway, Nitrogen Metabolism and Fungal Virulence. *The EMBO Journal* **26**(15): 3673-3685.
- Wingler A, Delatte TL, E. OHL, Primavesi LF, Jhurrea D, Paul M, Schluepmann H. 2012.** Trehalose-6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiology* **158**: 1241-1251.
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA. 2000.** Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**: 105-114.
- Xie Z-P, Staehelin C, Broughton WJ, Wiemken A, Boller T, Müller J. 2003.** Accumulation of soluble carbohydrates, trehalase and sucrose synthase in effective (Fix+) and ineffective (Fix-) nodules of soybean cultivars that differentially nodulate with *Bradyrhizobium japonicum*. *Functional Plant Biology* **30**: 965-971.
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc JP, Mitchell RAC, Powers SJ, Schluepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ. 2009.** Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiology* **149**: 1860-1871.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

S1. CONSTRUCCIONES REALIZADAS

Para analizar la expresión génica de *PvTRE1* y *PvTPS6c2* se clonaron sus regiones promotoras. Para determinar la participación de estos genes en *P. vulgaris* durante la interacción simbiótica se realizaron construcciones para su silenciamiento génico; además, también se realizó una construcción para sobre-expresar una TPS heteróloga de origen procarionta (*ReTPS*), y determinar el impacto de la T6P en el nódulo. Las construcciones realizadas para este proyecto se enlistan en la Tabla S1.

S1.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

La región promotora amplificada de *PvTRE1* correspondió a un fragmento de 1.9 kb, y la región promotora amplificada de *PvTPS6c2* correspondió a un fragmento de 1.6 kb. Ambas regiones promotoras amplificadas se clonaron en el vector pBGWFS7 (Karimi *et al.*, 2007), para generar las construcciones pBGWFS7_PvTRE1PR y pBGWFS7_PvTPS6c2PR (Figura S1). En ambos casos las regiones promotoras se fusionaron a los genes reporteros de la *proteína verde fluorescente* (*GFP*) fusionada con la β -*Glucuronidasa* (*GUS*). Para verificar las raíces transformadas, y determinar en que tejidos se expresan *PvTRE1* y *PvTPS6c2* en las raíces noduladas se realizó el ensayo de tinción de GUS (Jefferson *et al.*, 1987; Estrada-Navarrete *et al.*, 2007).

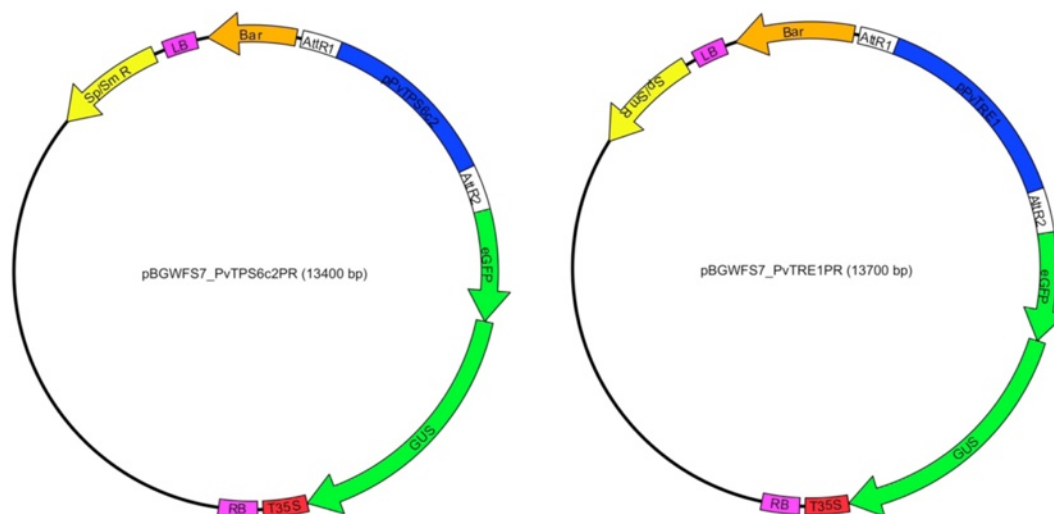


Figura S1. Construcciones pBGWFS7_PvTPS6c2PR y pBGWFS7_PvTRE1PR. Las regiones promotoras de *PvTPS6c2* y *PvTRE1* se fusionaron con los genes reporteros *GFP:GUS*.

S1.2 SILENCIAMIENTO GÉNICO

Las regiones 3'-no traducida de *PvTPS6c2*, y la región 3'-codificante de *PvTRE1* se amplificaron por PCR. Ambos fragmentos amplificados se clonaron en el vector pTdT-DC-RNAi (Valdés-López *et al.*, 2008), para generar las construcciones pTdT-PvTPS6c2-RNAi y pTdT-PvTRE1-RNAi (Figura S2). En ambos casos se utilizó la emisión de fluorescencia roja de la proteína reportera Td-tomato (TdT) para la verificación de las raíces transgénicas (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007; Valdés-López *et al.*, 2008).

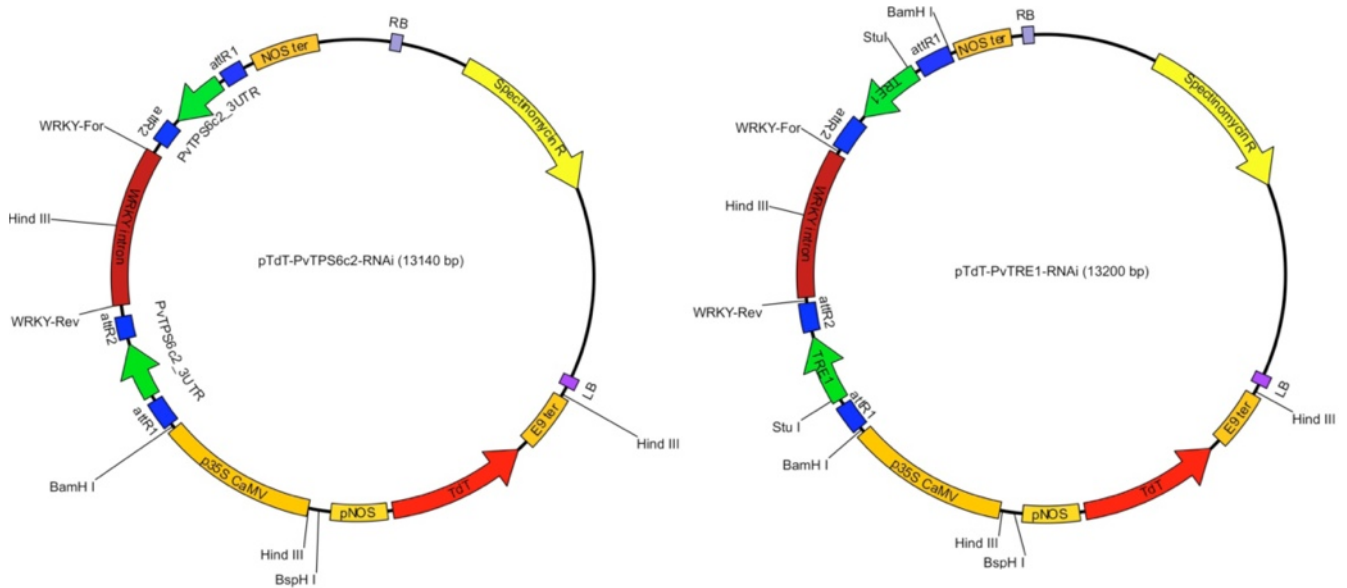


Figura S2. Construcciones pTdT-PvTPS6c2-RNAi y pTdT-PvTRE1-RNAi. La región 3'-no traducida de *PvTPS6c2* se clonó en pTdT-DC-RNAi, para el silenciamiento de *PvTPS6c2*. La región 3'-codificante de *PvTRE1* se clonó en pTdT-PvTRE1-RNAi, para el silenciamiento de *PvTRE1*.

S1.3 SOBRE-EXPRESIÓN

El marco abierto de lectura de la *TPS* cromosomal de *R. etli* (*ReTPS*) se amplificó por medio de PCR. El marco de lectura amplificado de *ReTPS* se clonó mediante los sitios de restricción *NcoI* y *BglIII* en el vector pCAMBIA-1304 para generar la construcción pCAMRT2 (Figura S3). *ReTPS* se clonó en fase con los genes reporteros *GFP:GUS*, en la construcción pCAMRT2, para verificar las raíces transgénicas mediante la emisión de fluorescencia verde de la proteína reportera GFP, y después realizar análisis de imágenes por microscopía láser confocal de las raíces y nódulos transgénicos (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007).

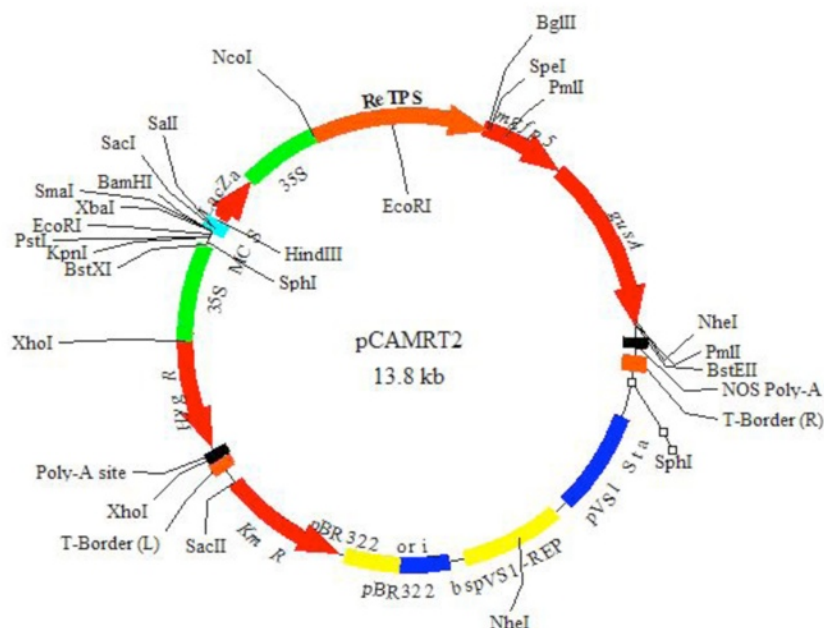


Figura S3. Construcciones pCAMRT2. El marco abierto de lectura de la TPS cromosomal de *R. etli* (*ReTPS*) se clonó en fase con los genes reporteros *GFP:GUS*, en el vector pCAMBIA-1304.

En la Tabla S1 se resumen los fragmentos amplificados, vectores de clonación, vectores de subclonación, y el objetivo de la construcción final.

Tabla S1. Secuencias amplificadas y construcciones realizadas.

Secuencias Amplificadas	Clonados en:	Subclonados en:	Construcción	Objetivo
Región 3'-no traducida de <i>PvTPS6c2</i> (300 pb)	pENTR-D-TOPO	pTdT-DC-RNAi	pTdT-PvTPS6c2-RNAi	Silenciamiento <i>PvTPS6c2</i>
<i>ReOtsA</i> (<i>TPS</i>), TPS de <i>R. etli</i> (1500 pb)	pCR2.1-TOPO	pCAMBIA-1304	pCAMRT2	Sobre-expresión <i>ReTPS</i>
<i>PvTRE1</i> (220 pb)	pENTR-D-TOPO	pTdT-DC-RNAi	pTdT-PvTRE1-RNAi	Silenciamiento <i>PvTRE1</i>
Región promotora de <i>PvTPS6c2</i> (<i>PvTPS6c2</i> , 1600 pb)	pENTR-D-TOPO	pBGWFS7	pBGWFS7_PvTPS6c2PR	Análisis del promotor de <i>PvTPS6c2</i>
Región promotora de <i>PvTRE1</i> (1900 pb).	pENTR-D-TOPO	pBGWFS7	pBGWFS7_PvTRE1PR	Análisis del promotor de <i>PvTRE1</i>
GUSa (300 pb)	pENTR-D-TOPO	pTdT-DC-RNAi	pTdT-GUS-RNAi	Silenciamiento de β -Glucuronidasa

S2. CEPAS DE *Agrobacterium rhizogenes* K599 GENERADAS

Las cepas de *A. rhizogenes* K599 generadas se clasificaron acorde a la construcción o vector que se utilizó para la transformación genética de las mismas. La clasificación es la siguiente:

S2.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

Las cepas de *A. rhizogenes* K599 con las construcciones pBGWFS7_PvTRE1PR y pBGWFS7_PvTPS6c2PR fueron utilizadas para la generación de plantas compuestas de *P. vulgaris*

(Estrada-Navarrete *et al.*, 2007), y realizar el análisis de la expresión de *PvTRE1* y *PvTPS6c2* (Figura S1).

S2.2 SILENCIAMIENTO GÉNICO

Las cepas de *A. rhizogenes* K599 con las construcciones pTdT-PvTRE1-RNAi y pTdT-PvTPS6c2-RNAi fueron utilizadas para la generación de plantas compuestas de *P. vulgaris* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007), y realizar el silenciamiento o disminución de la expresión de *PvTRE1* y *PvTPS6c2* (Figura S2).

S2.3 SOBRE-EXPRESIÓN

A. rhizogenes K599 con la construcción pCAMRT2 fue utilizada para la generación de plantas compuestas de *P. vulgaris* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007), y llevar a cabo la expresión heteróloga de *ReTPS*, con el uso del promotor CaMV35S (Figura S3).

S2.4 CONTROLES

Las cepas de *A. rhizogenes* K599 con los vectores pCAMBIA-1304, pTdT-DC-RNAi y pTdT-GUS-RNAi; así como a *A. rhizogenes* K599 sin vector fueron utilizadas para la generación de plantas compuestas de *P. vulgaris* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007), y servir como controles con respecto a los silenciamientos y sobre-expresión (Tabla S2).

Las cepas de *A. rhizogenes* K599 generadas y utilizadas para este proyecto se enlistan en la Tabla S2.

Tabla S2. Cepas de *A. rhizogenes* K599 utilizadas y generadas.

Cepa	Abreviatura	Marcador de Selección	Construcción	Reportero	Tipo de Construcción
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599	K599	-	-	-	Control
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 pCAMBIA-1304	pCAMBIA-1304	Kanamicina	pCAMBIA-1304	GFP:GUS	Control
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 pTdT-DC-RNAi	pTdT-DC-RNAi	Espectinomicina	pTdT-DC-RNAi	Td-Tomato	Control
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 pTdT-GUS-RNAi	pTdT-GUS-RNAi	Espectinomicina	pTdT-GUSa-RNAi	Td-Tomato	Control
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 prPvTPS6c2	prPvTPS6c2	Espectinomicina	pBGWFS7_PvTPS6c2pr	GFP:GUS	Análisis de Expresión
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 prPvTRE1	prPvTRE1	Espectinomicina	pBGWFS7_PvTRE1pr	GFP:GUS	Análisis de Expresión
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 pCAMRT2	pCAMRT2	Kanamicina	pCAMReTPS::GFP:GUS	GFP:GUS	Sobre-expresión
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 pTdT-PvTPS6c2-RNAi	PvTPS6c2-RNAi	Espectinomicina	pTdT-PvTPS6c2-RNAi	Td-Tomato	Silenciamiento
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 pTdT-PvTRE1-RNAi	PvTRE1-RNAi	Espectinomicina	pTdT-PvTRE1-RNAi	Td-Tomato	Silenciamiento

S3. TPSs

A partir de alineamientos de las secuencias deducidas de amino ácidos de los miembros de las familias génicas de TPSs clase I y clase II de *P. vulgaris* con sus respectivos genes homólogos en *Arabidopsis*, *E. coli*, y *S. cerevisiae* se determinó el porcentaje de identidad y similitud. Además, a partir de las secuencias deducidas de amino ácidos de los integrantes de las familias génicas de TPSs clase I y clase II de *P. vulgaris* se pudo deducir la estructura tridimensional de los dominios sintasa y, de los posibles, dominios fosfatasa presentes en estas TPSs vegetales (Leyman *et al.*, 2001); para así hacer la comparación y análisis de la estructura tridimensional deducida respecto a las estructuras cristalográficas depositadas en la base de datos PDB (“protein data bank”), u obtención de valores de RMSD, correspondientes a TPS (1UQU) y TPP (1U02) (Gibson *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2006), con el uso de PyMol (DeLano, 2002).

S3.1 TPSs CLASE I

Los integrantes de la familia de TPS clase I de *P. vulgaris* al compararlos con miembros de la familia de TPS clase I de *Arabidopsis* (AtTPS1-4) y ScTPS1 de levadura se determinó que un rango de porcentajes de identidad desde el 1.1% al 32.4%; los porcentajes de similitud los valores van desde 1.8% al 39.1% (Tabla S3).

Tabla S3. Análisis comparativo de los integrantes de la familia TPS clase I de *P. vulgaris* con sus homólogos en *Arabidopsis* y *S. cerevisiae*. Porcentajes de identidad y similitud de los integrantes de la familia de TPS clase I de *P. vulgaris* con respecto a sus homólogos de *Arabidopsis* y *S. cerevisiae*.

	AtTPS1		AtTPS2		AtTPS3		AtTPS4		ScTPS1	
	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %
PvTPS1_Class1	32.40%	36.10%	24.30%	29.70%	21.20%	27.30%	22.60%	27.90%	28.90%	39.10%
PvTPS2_Class1	27.40%	31.20%	24.60%	31.70%	24.90%	32.30%	25.60%	31.80%	7.60%	12.00%
PvTPS3_Class1	30.20%	35.60%	22.40%	29.90%	26.60%	34.50%	26.30%	34.20%	3.60%	5.90%
PvTPS4_Class1	28.00%	31.80%	20.00%	25.50%	17.20%	23.10%	20.10%	24.80%	22.00%	31.20%

El análisis de las secuencias de amino ácidos deducidos de los integrantes de la familia de TPSs clase I permitió determinar la presencia de los dominios sintasa y fosfatasa, característicos de las TPSs de origen vegetal, y además se determinó la ausencia de las cajas de actividad fosfatasas, característicos de las TPS clase I, para así confirmar que los integrantes de la familia de TPSs clase I, en efecto son TPSs clase I (Blázquez *et al.*, 1998; Leyman *et al.*, 2001). Los integrantes de la familia de TPSs clase I, PvTPS1class1, PvTPS2class1, PvTPS3class1 y PvTPS4class1 poseen un dominio sintasa en la región N-terminal, y un dominio fosfatasa carente de las cajas de actividad correspondientes en la región C-terminal, a excepción de PvTPS1class1 y PvTPS4class1; esta última carece del dominio fosfatasa (Figura 39). La deducción de las estructuras tridimensionales y su comparación con la estructura cristalográfica de cada dominio con las TPS (1UQU) y TPP (1U02) se muestran en la Tabla S4, con rangos de valores de RMSD desde 0.079 Å a 0.086 Å para el dominio sintasa; y con valores de RMSD de 0.110 Å para los únicos 65 amino ácidos del dominio fosfatasa de PvTPS2class1, y de 0.096 Å para los únicos 162 amino ácidos del dominio fosfatasa de PvTPS3class1. Los valores de RMSD para el dominio sintasa sugieren conservación de la estructura tridimensional. Los valores de RMSD para los

amino ácidos presentes del dominio fosfatasa sugieren una tendencia hacia la conservación de la estructura, sin embargo, en ambos casos (PvTPS2class1 y PvTPS3class1) no poseen un dominio fosfatasa completo; con 65 amino ácidos para PvTPS2class1 y 162 amino ácidos para PvTPS3class1.

Tabla S4. Análisis de la estructura tridimensional deducida de los integrantes de la familia de TPS clase I, de los dominios sintasa y fosfatasa, comparada con la estructura cristalográfica de TPS (1UQU) y TPP (1U02), para obtener los valores de RMSD correspondientes.

	Dominio TPS RMSD (Å)	Dominio TPP RMSD (Å)
PvTPS1class1	0.079	-----
PvTPS2class1	0.086	0.110
PvTPS3class1	0.086	0.096
PvTPS4class1	0.081	-----

S3.2 TPSs CLASE II

En la comparación de los integrantes de la familia de TPS clase II de *P. vulgaris* con los miembros de la familia de TPS clase II de *Arabidopsis* (AtTPS5-11) y con ScTPS2 de levadura; los porcentajes de identidad tuvieron un rango desde 24.7% al 77.1%, los porcentajes de similitud van desde el 39.6% al 86.8% (Tabla S5).

Tabla S5. Análisis comparativo de los integrantes de la familia TPS clase II de *P. vulgaris* con sus homólogos en *Arabidopsis* y *S. cerevisiae*. Porcentajes de identidad y similitud de los integrantes de la familia de TPS clase II de *P. vulgaris* con respecto a sus homólogos de *Arabidopsis* y *S. cerevisiae*.

	AtTPS5		AtTPS6_1		AtTPS6_2		AtTPS7		AtTPS8	
	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %
PvTPS1_Class2	76.40%	86.80%	70.00%	84.20%	57.20%	68.90%	65.40%	78.80%	60.70%	76.20%
PvTPS2_Class2	61.90%	76.40%	62.00%	75.90%	49.20%	60.80%	61.40%	75.40%	71.30%	83.70%
PvTPS3_Class2	59.60%	75.00%	59.50%	73.90%	47.90%	59.90%	58.60%	73.40%	69.50%	82.20%
PvTPS4_Class2	60.20%	77.00%	59.10%	74.50%	47.00%	59.40%	58.50%	75.00%	61.80%	75.30%
PvTPS5_Class2	53.40%	69.90%	53.30%	69.10%	42.50%	55.90%	52.40%	67.80%	57.80%	72.30%
PvTPS6_Class2	67.70%	80.70%	77.10%	86.10%	61.10%	68.80%	61.30%	76.10%	59.70%	74.00%
PvTPS7_Class2	58.90%	74.70%	58.40%	73.80%	45.00%	57.10%	57.10%	72.60%	63.60%	79.80%
	AtTPS9		AtTPS10		AtTPS11		ScTPS2			
	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %		
PvTPS1_Class2	61.00%	76.20%	58.70%	75.20%	56.10%	72.40%	25.30%	41.40%		
PvTPS2_Class2	72.90%	84.20%	72.40%	84.20%	58.10%	73.00%	24.70%	40.20%		
PvTPS3_Class2	69.90%	82.00%	68.90%	81.50%	56.50%	71.70%	24.70%	43.30%		
PvTPS4_Class2	62.20%	76.80%	59.50%	75.00%	64.80%	77.60%	24.70%	39.60%		
PvTPS5_Class2	58.50%	74.40%	57.70%	73.10%	51.60%	67.60%	26.00%	43.20%		
PvTPS6_Class2	59.80%	74.20%	58.90%	73.40%	55.50%	71.10%	25.20%	41.10%		
PvTPS7_Class2	64.70%	80.40%	64.70%	79.00%	55.90%	73.20%	25.50%	44.40%		

El análisis de las secuencias de amino ácidos deducidos de los integrantes de la familia de TPSs clase II permitió determinar la presencia de los dominios sintasa y fosfatasa, característicos de las TPSs de origen vegetal. En el dominio fosfatasa se determinó la presencia de las cajas de actividad fosfatasas, característicos de las TPS clase II y de las TPPs, confirmando que los integrantes de la familia de TPSs clase II, pertenecen a esta clasificación de TPSs (Leyman *et al.*, 2001). Los integrantes de la familia de

TPSs clase II, PvTPS1class2, PvTPS2class2, PvTPS3class2, PvTPS4class2, PvTPS5class2, PvTPS6class2 y PvTPS7class2 poseen un dominio sintasa en la región N-terminal, y un dominio fosfatasa con las cajas de actividad correspondientes en la región C-terminal (Figura 39). La deducción de las estructuras tridimensionales y su comparación con la estructura cristalográfica de cada dominio con las TPS (1UQU) y TPP (1U02) se muestran en la Tabla S6, con rangos de valores de RMSD desde 0.073 Å a 0.084 Å para el dominio sintasa; y con rangos de valores de RMSD de 0.082 Å a 0.097 Å. Los valores de RMSD para el dominio sintasa sugieren conservación de la estructura tridimensional. Los valores de RMSD para el dominio fosfatasa sugieren conservación de la estructura tridimensional.

Tabla S6. Análisis de la estructura tridimensional deducida de los integrantes de la familia de TPS clase II, de los dominios sintasa y fosfatasa, comparada con la estructura cristalográfica de TPS (1UQU) y TPP (1U02), para obtener los valores de RMSD correspondientes.

	Dominio TPS RMSD (Å)	Dominio TPP RMSD (Å)
PvTPS1class2	0.075	0.087
PvTPS2class2	0.074	0.086
PvTPS3class2	0.083	0.088
PvTPS4class2	0.083	0.097
PvTPS5class2	0.073	0.082
PvTPS6class2	0.084	0.084
PvTPS7class2	0.082	0.091

S4. TPPs

A partir de alineamientos de las secuencias deducidas de amino ácidos de los miembros de la familia génica de TPP (con dos integrantes, PvTPP1 y PvTPP2) de *P. vulgaris* con sus respectivos genes homólogos en *Arabidopsis*, *N. tabacum*, y *E. coli* se determinó el porcentaje de identidad y similitud. Además, a partir de las secuencias deducidas de amino ácidos de los integrantes de la familia génica de TPP de *P. vulgaris* se pudo deducir la estructura tridimensional, y realizar la comparación y análisis de la estructura tridimensional deducida respecto a la estructura cristalográfica depositada en la base de datos PDB, u obtención de valores de RMSD, correspondiente a TPP (1U02) (Rao *et al.*, 2006), con el uso de PyMol (DeLano, 2002).

Tabla S7. Análisis comparativo de los integrantes de la familia TPP de *P. vulgaris* con sus homólogos en *Arabidopsis*, *N. tabacum*, y *E. coli*. Porcentajes de identidad y similitud de los integrantes de la familia de TPP de *P. vulgaris* con respecto a sus homólogos de *Arabidopsis*, *N. tabacum*, y *E. coli*.

	AtTPPA		AtTPPB		NtTPP		EcOtsB	
	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %
PvTPP1	41.10%	47.30%	32.90%	40.80%	44.10%	49.10%	16.40%	27.80%
PvTPP2	38.20%	44.50%	31.50%	41.10%	39.90%	44.90%	19.60%	32.00%

El análisis de las secuencias de amino ácidos deducidos de los integrantes de la familia de TPPs de *P. vulgaris* determinó la presencia de las cajas de actividad fosfatasas, característicos de las TPPs (Figura

S4), confirmando a PvTPP1 y PvTPP2 como integrantes de la familia de TPPs (Vogel *et al.*, 1998; Leyman *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2006). La deducción de las estructuras tridimensionales y su comparación con la estructura cristalográfica de TPP (1U02) se muestran en la Tabla S8, con de valores de RMSD de 0.094 Å para PvTPP1, y de 0.088 Å para PvTPP2. Los valores de RMSD para ambos integrantes de la familia TPP de *P. vulgaris* sugieren conservación de la estructura tridimensional (Tabla S8).

Tabla S8. Análisis de la estructura tridimensional deducida de los integrantes de la familia de TPP comparada con la estructura cristalográfica de TPP (1U02), para obtener los valores de RMSD correspondientes.

	Dominio TPP RMSD (Å)
PvTPP1	0.094
PvTPP2	0.088

ScTPS2	F	L	F	D	Y	D	G	T	L	T	P	I	V	K	D	P	A	W	I	I	S	G	R	D	Q	K
ZrTPP	F	L	F	D	Y	D	G	T	L	T	P	I	V	Q	D	P	A	W	I	I	S	G	R	D	Q	K
EnTPP	F	M	F	D	Y	D	G	T	L	T	P	I	V	Q	D	P	A	W	I	I	S	G	R	D	Q	K
TcOtsB	F	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	A	P	I	V	A	K	R	P	E	Y	V	V	T	G	R	R
MelOtsB	V	F	F	D	F	D	G	T	L	L	S	D	I	V	D	D	P	D	A	I	L	I	S	G	R	R
CaTPP	F	L	F	D	Y	D	G	T	L	L	T	P	I	V	Q	D	P	A	W	I	I	S	G	R	D	Q
EcOtsB	W	F	F	D	L	D	G	T	L	L	A	E	I	K	P	H	P	D	A	L	I	S	G	R	R	
OsTPP	V	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	D	D	P	D	A	I	L	S	G	R	R	
MylOtsB	V	F	F	D	F	D	G	T	L	L	S	D	I	V	D	D	P	D	A	I	L	S	G	R	R	
SeOtsB	Y	F	F	D	L	D	G	T	L	L	A	E	I	K	P	H	P	D	A	L	I	S	G	R	R	
EsOtsB	F	F	F	D	L	D	G	T	L	L	A	E	I	K	P	H	P	D	A	L	I	S	G	R	R	
CkOtsB	Y	F	F	D	L	D	G	T	L	L	A	E	I	K	P	H	P	D	A	L	I	S	G	R	R	
XcOtsB	L	F	L	D	V	D	G	T	L	L	I	D	F	A	H	T	P	E	A	L	V	S	G	R	R	
MiTPP	V	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	A	D	P	D	A	I	V	S	G	R	R	
PhTPP	L	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	A	D	P	D	A	I	V	S	G	R	R	
MsTPP	V	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	A	D	P	D	A	I	V	S	G	R	R	
AtTPP	M	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	E	D	P	D	A	I	V	T	G	R	R	
AgTPP	L	L	L	D	Y	D	G	T	L	L	A	E	L	T	S	H	P	N	A	V	I	S	G	R	R	
SaOtsB	W	F	F	D	L	D	G	T	L	L	I	D	I	A	D	H	P	D	A	V	V	S	G	R	R	
PfOtsB	I	C	L	D	F	D	G	T	L	L	A	P	I	V	A	D	P	Q	A	I	V	T	G	R	R	
AbOtsB	V	F	F	D	Y	D	G	T	L	L	A	P	I	V	E	R	P	D	A	V	V	T	G	R	R	
TiOtsB	F	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	T	A	P	I	A	Q	R	P	E	Y	V	T	G	R	R	
NiTPP	L	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	D	D	P	D	A	I	I	S	G	R	R	
CrTPP	V	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	T	P	I	V	S	N	P	D	A	I	I	S	G	R	R	
MaTPP	F	M	F	D	Y	D	G	T	L	L	T	P	I	V	R	E	P	S	W	I	I	S	G	R	R	
AtTPPB	M	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	R	E	P	D	A	I	V	T	G	R	R	
SpTPP1	F	M	M	D	Y	D	G	T	L	L	T	P	I	V	R	D	P	N	W	I	I	S	G	R	R	
AtTPPA	V	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	T	A	P	I	V	D	D	P	D	A	I	I	S	G	R	
SITPSP	V	I	L	G	F	N	S	T	L	L	T	A	Q	V	E	A	P	R	V	I	L	S	G	R	S	
LbTPP	F	L	F	D	Y	D	G	T	L	L	A	P	I	V	K	T	P	S	Y	I	I	S	G	R	R	
PsOtsB	F	F	F	D	V	D	G	T	L	L	A	E	I	Q	P	R	P	E	A	V	I	S	G	R	R	
PvTPP1	L	F	M	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	D	N	P	D	A	I	I	S	G	R	R	
PvTPP2	L	F	L	D	Y	D	G	T	L	L	S	P	I	V	D	N	P	D	A	I	I	S	G	R	R	

ScTPS2	N	K	G	E	I	V	K	R	L	V	W	H	Q	H	D	F	V	L	C	L	G	D	D	F	T	D	E	D	M	F	R	Q								
ZrTPP	N	K	G	E	I	V	K	R	L	V	W	H	Q	H	E	F	T	L	C	C	S	G	D	D	F	T	D	E	E	D	M	F	R	Q						
EnTPP	N	K	G	F	I	A	T	R	L	V	Q	A	Y	H	E	F	I	L	C	C	S	G	D	D	F	T	D	E	E	D	M	F	R	Q						
TcOtsB	D	K	G	Q	A	V	L	R	L	L	G	R	H	P	H	L	M	P	I	C	L	G	D	D	T	T	D	E	E	A	F	L	A	S						
MelOtsB	D	K	G	K	T	L	H	W	V	I	D	R	L	H	L	D	M	P	I	C	L	G	D	D	I	T	D	E	E	D	A	F	D	A	S					
CaTPP	N	K	G	E	I	V	K	R	L	V	L	H	P	H	P	D	F	M	L	C	L	G	D	D	L	T	D	E	E	D	S	M	F	N	A	V				
EcOtsB	S	K	G	E	A	I	A	A	F	M	Q	E	A	P	R	T	P	V	V	F	V	G	D	D	L	T	D	E	E	D	A	F	K	V	A	V				
OsTPP	D	K	G	K	A	V	E	F	L	L	Q	S	L	G	V	I	P	I	Y	L	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	F	K	V	A	V					
MylOtsB	D	K	G	K	T	L	H	W	V	I	D	R	L	H	L	M	P	I	C	L	G	D	D	I	T	D	E	E	D	A	F	D	A	V	A	V				
SeOtsB	N	K	G	E	A	I	A	A	F	M	Q	E	A	P	R	I	P	V	F	V	V	G	D	D	L	T	D	E	E	A	G	F	G	V	V	A	V			
EsOtsB	N	K	G	E	A	L	K	A	F	M	Q	E	A	P	R	T	P	V	F	V	V	G	D	D	L	T	D	E	E	A	G	F	S	D	V	V	A	V		
CkOtsB	N	K	G	E	A	I	A	A	F	M	Q	E	A	P	R	T	P	V	F	V	V	G	D	D	L	T	D	E	E	A	G	F	D	Q	V	A	V			
XcOtsB	N	K	G	L	A	V	E	Q	L	M	Q	Q	P	A	P	R	T	P	V	F	V	V	G	D	D	L	T	D	E	E	F	G	F	D	V	A	V			
MiTPP	D	K	G	R	A	L	E	F	L	L	E	S	L	G	V	F	P	I	Y	I	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	F	K	V	A	V	A	V			
PhTPP	D	K	G	K	A	V	E	F	L	L	E	S	L	G	V	L	P	I	Y	I	V	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	F	K	V	A	V	A	V		
MsTPP	D	K	G	R	A	L	E	F	L	L	E	S	L	G	V	V	F	P	I	Y	I	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	F	K	V	A	V	A	V		
AtTPP	D	K	G	Q	A	L	N	F	L	L	K	S	L	G	V	V	P	V	Y	I	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	F	K	V	A	V	A	V			
AgTPP	N	K	G	L	A	A	E	Y	I	L	L	G	T	S	F	R	K	V	L	A	I	F	G	D	D	T	T	D	E	E	D	A	V	M	R	A	V	A	V	
SaOtsB	T	K	A	Q	A	I	H	T	L	L	T	L	W	N	E	P	G	A	I	F	G	D	D	W	T	D	E	E	D	G	F	R	A	V	A	V	A	V		
PfOtsB	D	K	G	D	V	V	A	K	L	L	D	D	P	S	-	A	A	A	F	C	G	D	D	L	G	D	I	E	S	A	F	F	A	V	A	V	A	V		
AbOtsB	D	K	G	K	A	V	L	S	L	L	D	T	L	G	P	T	L	P	L	Y	I	G	D	D	E	T	D	E	E	A	A	F	F	R	A	V	A	V		
TiOtsB	D	K	G	Q	A	V	L	R	L	L	E	R	L	H	P	H	T	P	V	Y	I	G	D	D	T	T	D	E	E	A	A	F	F	L	A	V	A	V		
NiTPP	D	K	G	K	A	V	E	F	L	L	V	S	L	G	V	V	L	P	I	Y	V	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	A	F	F	K	R	T	A	V	
CrTPP	H	K	G	T	A	L	S	H	L	V	E	D	A	L	G	V	V	A	I	Y	V	G	D	D	H	T	D	E	E	D	A	A	F	F	K	R	T	A	V	
MaTPP	N	K	G	E	I	A	K	R	L	I	A	T	Y	H	E	V	F	A	L	C	M	G	D	D	F	T	D	E	E	D	A	M	F	R	S	V	A	V		
AtTPPB	D	K	G	Q	A	L	N	F	L	L	K	S	L	G	V	V	P	V	Y	I	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	M	F	K	V	A	V	A	V		
SpTPP1	N	K	G	G	I	V	K	Q	I	L	E	S	Y	P	S	L	F	I	F	C	A	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	M	F	F	K	R	S	V	A	V
AtTPPA	N	K	G	R	A	V	E	F	L	L	E	S	L	V	L	D	L	P	I	Y	I	G	D	D	T	T	D	E	E	D	A	M	F	F	K	R	S	V	A	V
SITPSP	S	K	G	S	A	I	D	F	I	L	L	G	E	I	V	L	Y	V	L	C	A	G	D	D	F	L	K	D	E	E	D	A	I	Y	T	F	A	V	A	V
LbTPP	N	K	G	E	I	V	K	R	I	L	Y	Q	N	P	E	F	I	F	C	A	G	D	D	K	T	D	E	E	D	A	M	F	R	A	V	A	V	A	V	
PsOtsB	S	K	G	E	V	I	R	A	F	M	Q	E	A	P	R	V	T	P	V	F	L	G	D	D	L	T	D	E	E	A	G	F	F	A	V	A	V	A	V	
PvTPP1	D	K	G	K	A	V	T	F	L	L	E	S	L	G	V	L	P	I	Y	I	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	A	F	F	K	V	A	V	A	V	
PvTPP2	D	K	G	K	A	V	T	F	L	L	E	S	L	G	V	L	A	I	Y	I	V	G	D	D	R	T	D	E	E	D	A	A	F	F	K	V	A	V	A	V

Figura S4. Alineamiento de los integrantes de la familia de TPP de *P. vulgaris* con sus homólogos de *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Emericella nidulans*, *Thermus caldophilus*, *Mesorhizobium loti*, *Candida albicans*, *Oryza sativa*, *Medicago truncatula*, *E. coli*, *Mycobacterium leprae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter sp*, *Citrobacter koseri*, *Xanthomonas campestris*, *Petunia x hibrida*, *Medicago sativa*, *Arabidopsis lyrata*, *Anopheles gambiae*, *Sulfobacillus acidophilus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Azospirillum brasilense*, *Thermus thermophilus*, *Nicotiana tabacum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Metarhizium anisopliae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. lepidophylla*, *Laccaria bicolor*, *Pseudomonas stutzeri*. Los residuos resaltados en naranja corresponden a las cajas de actividad fosfatasa (Leyman *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2006). Los residuos resaltados en verde claro corresponden a residuos aledaños a las cajas de actividad fosfatasa (Rao *et al.*, 2006).

Las secuencias deducidas de amino ácidos para los integrantes de la familia génica de TPP se alinearon con sus respectivos homólogos de *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Emericella nidulans*, *Thermus caldophilus*, *Mesorhizobium loti*, *Candida albicans*, *Oryza sativa*, *Medicago truncatula*, *E. coli*, *Mycobacterium leprae*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter sp*, *Citrobacter koseri*, *Xanthomonas campestris*, *Petunia x hibrida*, *Medicago sativa*, *Arabidopsis lyrata*, *Anopheles gambiae*, *Sulfobacillus acidophilus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Azospirillum brasilense*, *Thermus thermophilus*, *Nicotiana tabacum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Metarhizium anisopliae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. lepidophylla*, *Laccaria bicolor*, *Pseudomonas stutzeri* y analizarlas por medio de MEGA5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

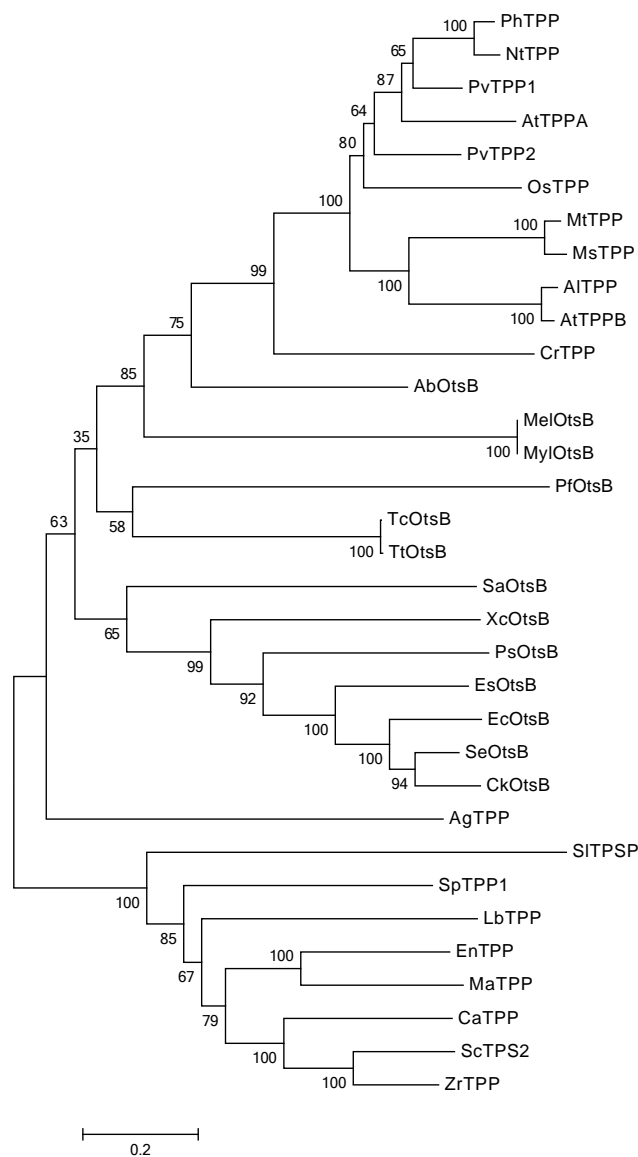


Figura S5. Árbol filogenético de los integrantes de la familia de TPP de *P. vulgaris*. Los integrantes de la familia de TPP se compararon con sus correspondientes homólogos de *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, *E. nidulans*, *T. caldophilus*, *M. loti*, *C. albicans*, *O. sativa*, *M. truncatula*, *E. coli*, *M. leprae*, *S. enterica*, *E. sp*, *C. koseri*, *X. campestris*, *Petunia x hibrida*, *M. sativa*, *A. lyrata*, *A. gambiae*, *S. acidophilus*, *P. freudenreichii*, *A. brasilense*, *T. thermophilus*, *N. tabacum*, *C. reinhardtii*, *M. anisopliae*, *S. pombe*, *S. lepidophylla*, *L. bicolor*, *P. stutzeri*.

El árbol filogenético generado del alineamiento de las TPP de *P. vulgaris* con sus homólogos agrupó a estos en el clado de las TPPs de plantas (Figura S5), lo que sugiere conservación a nivel de secuencia (Leyman *et al.*, 2001; Avonce *et al.*, 2006; Lunn, 2007).

S5. TREs

A partir de alineamientos de la secuencia deducida de amino ácidos de la trehalasa de *P. vulgaris* con sus respectivos genes homólogos en *Arabidopsis*, *G. max*, *E. coli*, y *S. cerevisiae* (trehalasa neutral y

trehalasa ácida) se determinó el porcentaje de identidad y similitud (Tabla S9). Además, a partir de la secuencia deducida de amino ácidos de la trehalasa de *P. vulgaris* se pudo deducir la estructura tridimensional para realizar la comparación y análisis de la estructura tridimensional deducida respecto a las estructura cristalográfica depositada en la base de datos PDB, para la obtención de valores de RMSD, correspondiente a la trehalasa (2WYN) (Gibson *et al.*, 2007), con el uso de PyMol (DeLano, 2002).

Tabla S9. Análisis comparativo de la trehalasa de *P. vulgaris* con sus homólogos en *Arabidopsis*, *G. max*, *E. coli*, y *S. cerevisiae* (trehalasa neutral y trehalasa ácida). Porcentajes de identidad y similitud de la trehalasa de *P. vulgaris* con respecto a sus homólogos de *Arabidopsis*, *G. max*, *E. coli*, y *S. cerevisiae* (trehalasa neutral y trehalasa ácida).

	AtTRE1		GmTRE1		EcTREp		ScNTH1		ScATH1	
	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %	Identidad %	Similitud %
PvTRE1	51.60%	66.50%	76.50%	81.20%	30.10%	44.90%	18.50%	30.20%	9.90%	18.00%

El análisis de la secuencia deducido de amino ácidos de la trehalasa de *P. vulgaris* determinó la presencia de módulos de residuos que integran el sitio activo (Figura 12), característicos de las trehalasas (Aeschbacher *et al.*, 1999; Gibson *et al.*, 2007). La deducción de la estructura tridimensional y su comparación con la estructura cristalográfica de la trehalasa de *E. coli* (2WYN) se muestra en la Tabla S10, con un valor de RMSD de 0.080 Å para PvTRE1. El valor de RMSD para PvTRE1 de *P. vulgaris* sugiere conservación de la estructura tridimensional.

Tabla S10. Análisis de la estructura tridimensional deducida de la trehalasa de *P. vulgaris* comparada con la estructura cristalográfica de la trehalasa (2WYN), para obtener el valor de RMSD correspondiente.

	Dominio TRE RMSD (Å)
PvTRE1	0.080

Down-regulation of *PvTRE1* enhances nodule biomass and bacteroid number in the common bean

Aarón Barraza¹, Georgina Estrada-Navarrete¹, Maria Elena Rodriguez-Alegria², Agustín Lopez-Munguia², Enrique Merino³, Carmen Quinto¹ and Federico Sanchez¹

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México;

²Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México;

³Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México

Author for correspondence:

Federico Sanchez

Tel: +52 777 329 1653

Email: federico@ibt.unam.mx

Received: 1 June 2012

Accepted: 12 September 2012

New Phytologist (2013) **197**: 194–206

doi: 10.1111/nph.12002

Key words: bacteroid survival, nodules, *Phaseolus vulgaris*, RNAi, trehalase, trehalose.

Summary

- Legume–rhizobium interactions have been widely studied and characterized, and the disaccharide trehalose has been commonly detected during this symbiotic interaction. It has been proposed that trehalose content in nodules during this symbiotic interaction might be regulated by trehalase. In the present study, we assessed the role of trehalose accumulation by down-regulating trehalase in the nodules of common bean plants.
- We performed gene expression analysis for trehalase (*PvTRE1*) during nodule development. *PvTRE1* was knocked down by RNA interference (RNAi) in transgenic nodules of the common bean.
- *PvTRE1* expression in nodulated roots is mainly restricted to nodules. Down-regulation of *PvTRE1* led to increased trehalose content (78%) and bacteroid number (almost one order of magnitude). In addition, nodule biomass, nitrogenase activity, and *GOGAT* transcript accumulation were significantly enhanced too.
- The trehalose accumulation, triggered by *PvTRE1* down-regulation, led to a positive impact on the legume–rhizobium symbiotic interaction. This could contribute to the agronomical enhancement of symbiotic nitrogen fixation.

Introduction

Biological nitrogen fixation is carried out only by prokaryotes in an enzymatic complex called nitrogenase where atmospheric nitrogen (N₂) is reduced to ammonia. The importance of this mutualistic interaction arises from the fact that legumes are an important source of protein in the diet of many countries worldwide, and symbiotic fixed nitrogen makes a major contribution to this, accounting for roughly 200 million tons of nitrogen annually (Graham & Vance, 2003; Kouchi *et al.*, 2010). Leguminous plants are the second largest group of food and feed crop species grown globally, and represent the third largest group of angiosperm species. A key developmental process in this remarkable plant–bacteria interaction is the formation on plant roots of novel organs called nodules, wherein rhizobia differentiate into their intracellular nitrogen-fixing form, known as bacteroids. These structures develop after exchange and recognition of signaling molecules between the rhizobial bacteria and the leguminous plant (Gage, 2004; Ferguson *et al.*, 2010).

The ontogeny of nodules has been characterized genetically, biochemically, and at the physiological and molecular levels throughout all stages, leading to successful and efficient symbiosis (Streeter, 1987; Fougère *et al.*, 1991; Salminen & Streeter, 1992; López *et al.*, 2008; Kouchi *et al.*, 2010). Recently, the metabolites

produced at the beginning of the rhizobium–legume symbiotic interaction were analyzed by high-throughput methods (metabolome analysis) and a significant induction in the biosynthesis of 166 metabolites was found, corresponding to flavonoids, amino acids, fatty acids, carboxylic acids, and carbohydrates, with trehalose among the metabolites induced to the greatest extent (Breckenmacher *et al.*, 2010). In *Phaseolus vulgaris* (common bean) interacting with *Rhizobium*, enhanced germination, quality, and grain yield have been correlated with trehalose content, and a higher tolerance to abiotic stress has been reported (Fariás-Rodríguez *et al.*, 1998; Altamirano-Hernández *et al.*, 2007).

Trehalose (α -D-glucopyranosyl-1,1- α -D-glucopyranoside) is a nonreducing disaccharide. Trehalose biosynthetic and degradation pathways are widespread throughout bacteria, archaeobacteria, fungi, metazoans (except for vertebrates), and plants (Avonce *et al.*, 2006). Trehalose (and its precursor trehalose-6-phosphate) is a signaling molecule involved in growth, development, and differentiation in plant cells (Paul *et al.*, 2008). There are five reported biosynthetic pathways for trehalose, but only one for degradation. Trehalose degradation is carried out by trehalase, yielding two glucose moieties (Avonce *et al.*, 2006). Although trehalose is commonly detected during the legume–rhizobia symbiosis, from rhizobia recognition by root hairs through nodule development and nitrogen fixation, trehalose metabolism in

leguminous plants is still poorly understood (Müller *et al.*, 2001b; Brechenmacher *et al.*, 2010; Vauclare *et al.*, 2010). Moreover, the importance of trehalose metabolism in plant–microbe interactions, such as legume–rhizobium, plant–mycorrhiza, and plant–pathogen interactions, has recently been highlighted (Müller *et al.*, 2001b; Brodmann *et al.*, 2002; Foster *et al.*, 2003; Ocón *et al.*, 2007; Nehls, 2008; Wilson *et al.*, 2010).

In senescent nodules, trehalose becomes the most abundant nonstructural carbohydrate, as evidenced by the fact that the sucrose content was found to undergo a marked (84%) decrease, while up to one-half of the trehalose remained during nodule senescence (Müller *et al.*, 2001b). Nodule trehalose biosynthesis and catabolism seem to be two separate, albeit interconnected, processes, as trehalose in the symbiosomes is not degraded by the trehalase present in the cytosol of the infected cells of the nodules, and the concentrations of trehalose inside the symbiosomes are kept constant throughout nitrogen fixation (Vauclare *et al.*, 2010).

Three approaches have been described to study the role of trehalose in the symbiotic process: addition of validamycin A directly to the nodules to inhibit trehalase enzymatic activity; overexpression of the endogenous trehalose phosphate synthase (TPS) from *Rhizobium* to enhance trehalose accumulation in *Rhizobium* before and during symbiotic interaction with leguminous plants; and mutating genes for trehalose assimilation in *Sinorhizobium* to induce trehalose accumulation in *Sinorhizobium*. Induction of trehalose accumulation in nodules of leguminous plants through validamycin A addition leads to improvement of tolerance to drought and salinity stress. Overexpression of endogenous rhizobial TPS or mutating trehalose assimilation genes enhances trehalose accumulation in bacteria as well as in bacteroids, leading to a significant increase in nodule biomass and nitrogenase activity and conferring abiotic stress tolerance to the plant (Jensen *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2008; López *et al.*, 2009).

Trehalose accumulation in the cytosol of infected nodule cells strongly suggests that induction of trehalose synthesis and degradation during nodule development are tightly regulated. Furthermore, trehalose metabolism directly impacts photosynthate partitioning and utilization in sink organs such as nodules, which constantly require carbohydrates to fuel growth, N₂ fixation and assimilation (Aeschbacher *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2001a; Xie *et al.*, 2003; Van Dijken *et al.*, 2004). Trehalase transcripts are present in expressed sequenced tag (EST) databases of several leguminous plants during symbiosis (Pontius *et al.*, 2003; Ramírez *et al.*, 2005). In the common bean, only three sequences corresponding to trehalase (CV535700, CV537568, and CV535738) were found, from a total of 112 229 sequences deposited to date in the Common Bean Gene Index (DFCI/Common Bean Gene Index, v4.0, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). Interestingly, these ESTs are part of the same contig and were found only in the nodule transcriptome.

Herein, transgenic roots (composite plants) induced by *Agrobacterium rhizogenes* K599 (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2009; Sánchez-López *et al.*, 2011) were used to assess the role of trehalose in common bean symbiosis by knocking down *PvTRE1* transcript abundances by RNAi. Furthermore,

since genetic transformation in composite plants is restricted to roots and nodules, we evaluated the systemic effect of nodule trehalose accumulation on the untransformed upper part of the plant. This approach helped us to characterize and directly determine the role of trehalose metabolism in nodules of *P. vulgaris*, and revealed the tight relationship among nodules and the upper parts (leaves) of the plant during symbiotic interaction.

Materials and Methods

Plant materials and growth conditions

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Negro Jamapa 81 was used in this study. Seeds were surface-sterilized and germinated under sterile conditions for 2 d and then planted in pots with vermiculite (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). Plants were grown in a glasshouse with a controlled environment (26–28°C, 16:8 h light:dark) and were watered with B&D nutrient solution (2 mM CaCl₂·2H₂O, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM K₂HPO₄, 20 µM FeC₆H₅O₇, 500 µM MgSO₄·7H₂O, 500 µM K₂SO₄, 2 µM MnSO₄·H₂O, 4 µM H₃BO₃, 1 µM ZnSO₄·7H₂O, 4 µM CuSO₄·5H₂O, 0.2 µM CoSO₄·7H₂O, 2 µM Na₂MoO₄·2H₂O, 8 mM KNO₃; Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). The generation of composite common bean plants was done according to the protocol developed by Estrada-Navarrete *et al.* (2007). Hairy roots (3–6 cm long) emerging from the *A. rhizogenes* K599 infection site were observed during the second week post-infection. After confirming the presence of reporter genes (by epifluorescence microscopy), the normal (untransformed) root system was excised and composite common bean plants were replanted in pots with vermiculite. Immediately after transferring *A. rhizogenes*-transformed roots of composite common bean plants into pots with fresh vermiculite, each transformed root was inoculated by adding 1 ml of the *Rhizobium etli* strain CFN42 culture directly. These were grown for 21 d postinoculation (dpi) under controlled environmental conditions and watered with B&D nitrogen-free nutrient solution (the same reagent chemical composition without 8 mM KNO₃). After this period, transgenic roots and nodules were collected in liquid nitrogen and stored at –80°C until they were used for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis and carbohydrate profile analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). Alternatively, transgenic nodules were collected and immediately fixed in LR-White resin for detailed characterization by optical microscopy and transmission electron microscopy (TEM).

Bacterial strains and growth conditions

The *Rhizobium etli* strain CFN42 was grown in sterilized PY liquid culture (0.5% bactopeptone (w/v), 0.3% yeast extract (w/v), 7 mM CaCl₂·2H₂O) with 20 µg ml⁻¹ nalidixic acid at 30°C to a cell density of 5–8 × 10⁸ ml⁻¹. *A. rhizogenes* K599 (K599) was grown in sterilized LB solid culture (1% bactopeptone (w/v), 0.5% yeast extract (w/v), 1% NaCl (w/v), 1.5% agar (w/v)) at 30°C for 24 h. *A. rhizogenes* K599 with pBGWFS7_PvTRE1PR

was grown in sterilized LB solid culture with $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ spectinomycin at 30°C for 24 h. *A. rhizogenes* K599 with pTdT-DC-RNAi (empty vector), *A. rhizogenes* K599 with pTdT-GUS-RNAi, and *A. rhizogenes* K599 with pTdT-PvTRE1-RNAi were grown in sterilized LB solid culture with $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ spectinomycin at 30°C for 24 h. All of these *A. rhizogenes* K599 strains were used according to Estrada-Navarrete *et al.* (2007) to generate composite common bean plants.

Identification of trehalase gene in the common bean and phylogenetic analysis

We identified ESTs corresponding to the trehalase gene, which is directly involved in trehalose degradation, in the whole Common Bean Gene Index v.4.0 (DFCI, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>). In addition, we identified the promoter and complete coding sequence of trehalase by analyzing the whole common bean draft genome (Phytozome v8.0, <http://www.phytozome.net>; Mazorka, <http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/blast/>). The coding sequence of trehalase (*PvTRE1*) was analyzed with 'Pfam' at the Sanger Institute website, and was compared with other trehalase sequences deposited in GenBank using the 'BLASTX' tool at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis, with the neighbor-joining method and 1000 bootstrap replicates, of the reported trehalase protein sequences were performed using MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

Protein alignment and modeling of PvTRE1

Alignment of the proteins was performed with ClustalX (2.0.10). The alignments were adjusted based on the modeling data for PvTRE1. Modeling of PvTRE1 was performed using Swiss model (<http://swissmodel.expasy.org>) based on the known three-dimensional structure of trehalase from *Escherichia coli* (Gibson *et al.*, 2007; PDB code 2WYN). Visualization and calculations of root-mean-square deviation (RMSD) values for the modeling of PvTRE1 were performed with PyMol (DeLano, 2002).

Constructs and plant transformation

To generate a promoter analysis construct, primers were designed based on the *PvTRE1* promoter sequences obtained from the draft genome. The promoter region of *PvTRE1* (1900 bp) was amplified using the forward primer *PvTRE1PromFor*: CACCGGGTACATGTGTAATTACAATAAACTTCAA and the reverse primer *PvTRE1PromRev*: GAAAATGTGGCAATGAATTGATGAAAGAGAAG. The amplified fragment was cloned in the pENTR/SD/D-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced. The resulting pENTR-PvTRE1PR plasmid was recombined into the pBGWFS7 binary vector (Karimi *et al.*, 2007), producing the pBGWFS7_PvTRE1PR construct. The 3'-coding sequence of *PvTRE1* (*PvTRE1*, 220 bp) was amplified with the forward primer *PvTRERiFor*: CACCGAAGGCCTTCTAAAATCTGGGTTGC and the reverse primer *PvTRERiRev*: CAAACGTTTTCCCTAGACCAAAAAGAATAATGTTG. The

amplified fragment was cloned in the pENTR/SD/D-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced. The resulting pENTR-*PvTRE1* plasmid was recombined into the pTdT-DC-RNAi binary vector (Valdés-López *et al.*, 2008). The correct orientation was confirmed by PCR using the WRKY-5-Rev primer (GCAGAGGAGGAGAAGCTTCTAG) or WRKY-3-Fwd primer (CTTCTCAACCACAGGAATTCATC) and *PvTRERiFor* primer for the pTdT-PvTRE1-RNAi plasmid. The resulting pBGWFS7_PvTRE1PR (for expression analysis) and pTdT-PvTRE1-RNAi (for *PvTRE1* silencing by RNAi) plasmids were introduced by electroporation into *A. rhizogenes* K599 and were then used for plant transformation. Composite common bean plants were generated as described by Estrada-Navarrete *et al.* (2007). Putative transgenic hairy roots were confirmed by checking for the presence of green/red fluorescence, resulting from the expression of the green fluorescence protein (GFP)/tdTomato reporter gene, by epifluorescence microscopy. The composite common bean plants were grown in the glasshouse for 21 d as described earlier.

PvTRE1 promoter fusion to *GUS* to determine *PvTRE1* expression in nodules

After 21 dpi, the transgenic roots with nodules of composite common bean plants harboring pBGWFS7_PvTRE1PR (*pPvTRE1::GUS*) were collected for beta-glucuronidase (*GUS*) assays to perform the *PvTRE1* promoter analysis. The roots with nodules were incubated in X-Gluc buffer ($5\times$ GUS buffer, 100 ml: 250 mg X-Gluc, 0.1 g Triton X-100, 82.3 mg K-ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $M = 329.9 \text{ g mol}^{-1}$), 105.6 mg K-ferrocyanide ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $M = 422.4 \text{ g mol}^{-1}$) in 50 mM phosphate buffer) at 37°C for 10 h before clearing in acetone:methanol (1:3).

TEM and optical microscopy

Nodules (nine nodules per experiment) were embedded in LR-White resin after being fixed with 2% ρ -formaldehyde and 0.4% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), and subjected to a short dehydration ethanol series. Samples for optical microscopy were stained with toluidine blue. Sections of $7 \mu\text{m}$ were prepared with an ultramicrotome (Leica Ultracut R, Vienna, Austria). The optical microscopy analyses were performed with a light microscope (Motic BA300, Xiamen, China) and photographed with a digital camera (Motic M1000, Xiamen, China). Samples for TEM were stained with uranyl acetate. Thin sections of 60 nm were prepared with an ultramicrotome (Leica Ultracut R). The scanning electron microscopy analyses were performed with a Zeiss EM900 transmission electron microscope dual vision coupled cam system (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA).

Rhizobium reisolation from nodules and determination of colony-forming units (CFUs)

Nodules (nine nodules per experiment) were isolated from roots and surface-sterilized by immersion for 10 min in sodium hypochlorite (10% v/v). Each nodule was then homogenized in five

volumes of 100 mM MgCl₂ using a plastic pipette. Serial dilutions (10⁰–10⁻⁸) were plated (100 µl) onto PY solid medium with 20 µg ml⁻¹ nalidixic acid at 30°C and colonies were counted after 24 h.

Analysis of the carbohydrate profile by HPLC

Nodules and leaves from composite common bean plants at 21 dpi were collected, weighed, frozen in liquid nitrogen, and ground for extraction of total soluble carbohydrates (i.e. sugars) with 1 ml of ethanol 80% (v/v) for 10 min under agitation at 80°C. The supernatant was dried and dissolved in 1 ml of HPLC-grade water and immediately filtered with a 0.22 µm membrane to remove impurities. These extracts were analyzed by HPLC in a Waters-600E system controller (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a Waters 410 refractive index detector (Waters) and a carbohydrate analysis column (Kromasil NH₂-5 µm, Supelco, PA, USA). The temperature of the column was kept at 35°C, and the mobile phase used was acetonitrile:water (80:20) at a flow rate of 1.2 ml min⁻¹. Glucose, fructose, sucrose, maltose, and trehalose (Sigma-Aldrich) solutions were used as standards. Standard curves used to carry out the quantifications had an index correlation ranging from 0.9865 to 0.9928. Results were expressed as µg mg⁻¹ FW.

Biological nitrogen fixation

Nitrogen fixation was assayed using the acetylene reduction method (Vessey, 1994). Transgenic nodulated roots (21 dpi) were placed (nine individual roots per experiment) in a 160 ml vial closed with a serum cap. Immediately, air (4 ml) was withdrawn from the closed vial and replaced by acetylene gas. Ethylene production was assayed in a gas chromatograph and expressed as nmol ethylene min⁻¹ per nodule FW.

cDNA synthesis and qRT-PCR analysis

TRIzol reagent (Invitrogen) was used to isolate RNA from nodules at 21 dpi. For qRT-PCR analysis, RNA was treated with DNaseI (Invitrogen) to remove genomic DNA. The absence of DNA was confirmed by performing PCR (40 cycles, similar to the real-time PCR program) on the DNaseI-treated RNA using Taq-DNA polymerase. A LightCycler[®] 480 Real-time PCR system (Roche, Penzberg, Germany) was used for real-time PCR quantifications. qRT-PCR was performed according to the standard First Strand cDNA Synthesis kit with the Maxima[®] SYBR Green qPCR Master Mix (2×) protocol (Fermentas Life Sciences, Waltham, MA, USA). A 'no DNA' template control was used in each analysis. A list of primers used is given in Table S1. The results presented are from six independent ($n=6$) transgenic roots (or another organ) from different composite common bean plants; numbers in brackets indicate the composite common bean plant used in this study, and statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test. Each biological replicate was tested by triplicate and data were normalized to the *elongation factor 1-α* (*PvEF1α*) reference gene (Livak & Schmittgen, 2001).

Results

Identification of the trehalase gene in common bean

Three ESTs (CV535700, CV537568, and CV535738) corresponding to a single trehalase gene were identified in GenBank. With these, we were able to identify the complete coding sequence (scaffold00002) in the common bean draft genome (Phytozome v8.0, <http://www.phytozome.net>; Mazorka, <http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/blast/>). The trehalase gene was analyzed and its identity confirmed using the 'Pfam' and 'BLASTX' tools at The Sanger Institute and NCBI websites, respectively. The corresponding gene for trehalase indeed encodes for a protein that was found to belong to the trehalase protein family (with an *E*-value of 4.8×10^{-162}), and is homologous to the trehalase protein from *Glycine max*, with 81% identity and 86% similarity, and an *E*-value of 0.0; therefore the trehalase gene was designated as *PvTRE1*. *PvTRE1* has 10 exons and nine introns (Figs 1a, S1a). We carried out three-dimensional modeling of *PvTRE1* (Fig. 1a), and the RMSD value for alignment with the three-dimensional structure of trehalase from *E. coli* (EcTRE) was 0.080 Å (DeLano, 2002; Gibson *et al.*, 2007). Furthermore, we performed a phylogenetic analysis of *PvTRE1* with trehalases from plants, fungi, animals, and bacteria (Tamura *et al.*, 2011). The *PvTRE1* amino acid sequence grouped with trehalases from plants, specifically with trehalases from leguminous plants (*Medicago truncatula* and *G. max*; Fig. 1b).

PvTRE1 is strongly expressed in nodules of common bean plants

In addition to identifying the coding region for *PvTRE1*, the promoter region was also cloned. The regulatory sequence region of *PvTRE1* was analyzed with PlantPan (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis.php) and found to contain eight nodule-specific regulatory motifs related to those found in the promoter region of common bean *leghemoglobin A* (*PvLeghA*). Interestingly, the promoter region from *PvTRE1* has three more nodule regulatory motifs than does the promoter region of *PvLeghA*, and also more than the promoter regions of *M. truncatula* trehalase (three) and *GmTRE1* from *G. max* (six; Supporting Information, Fig. S1b). In order to determine the expression pattern of *PvTRE1*, the promoter region (1.9 kb of upstream sequence) of *PvTRE1* (p*PvTRE1*) was fused to the reporter gene *GUS*, and transformed into *A. rhizogenes* K599. At 21 dpi, *GUS* assays were performed on transgenic roots and nodules. *GUS* staining showed that expression of *PvTRE1* in nodulated roots is mainly restricted to nodules (Fig. 2b, and Fig. S1c). This result is in line with the bioinformatic analysis of the *PvTRE1* promoter region. In addition, we carried out a *PvTRE1* transcript accumulation analysis to determine the expression level of this gene in several organs (nodules, roots, leaves, pods, and seeds). *PvTRE1* is expressed at different levels in all the organs analyzed, except roots that have five times lower transcript abundance than nodules (Fig. S2a).

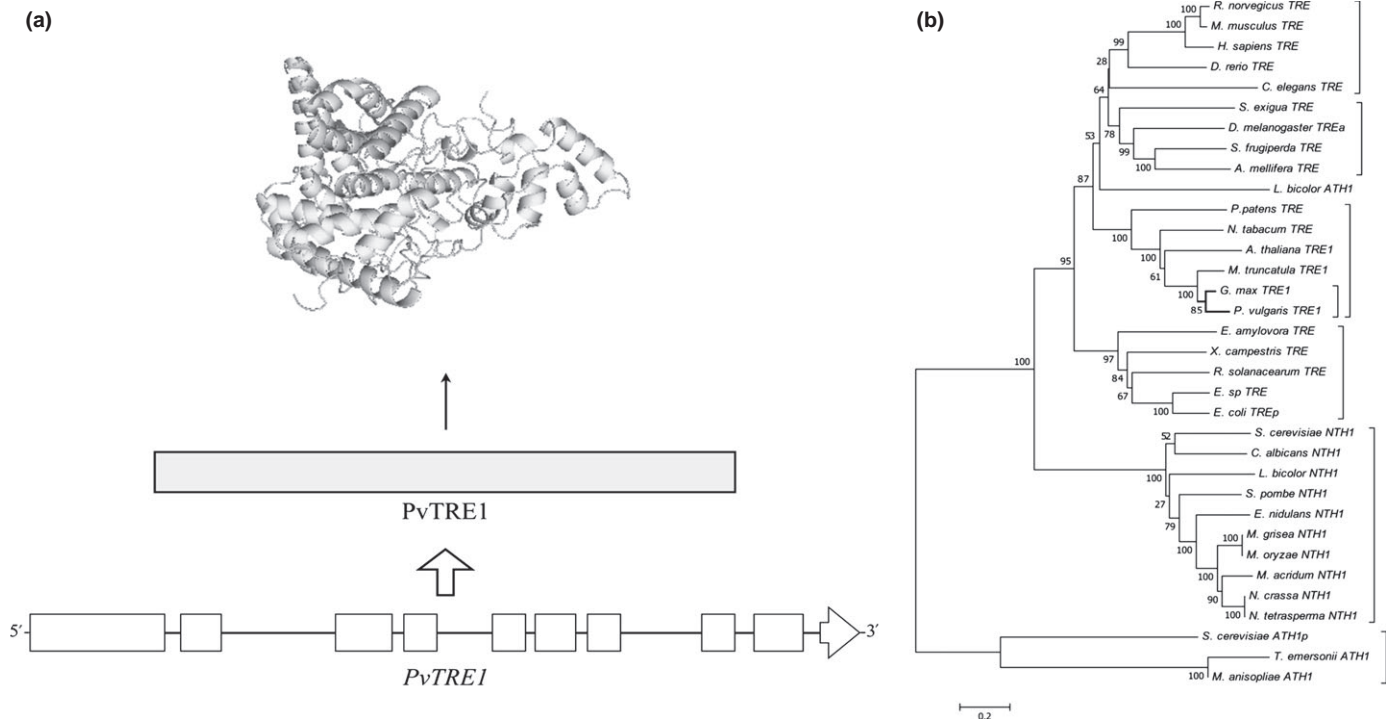


Fig. 1 Trehalase (*PvTRE1*) gene structure and protein structure, and phylogenetic analysis. (a) Schematic representation of the gene structure of *PvTRE1*, showing 11 exons and 10 introns, and *PvTRE1*; *PvTRE1* homology model constructed from the EcTRE template structure (Gibson *et al.*, 2007) by Swiss model and PyMol (DeLano, 2002). (b) The phylogenetic analysis of the trehalase amino acid sequences was conducted using the MEGA 5.0 program to generate a phylogenetic tree (TRE and TRE1, soluble and membrane-bound trehalases; NTH, neutral trehalases; ATH, acid trehalases) and the robustness of each cluster was verified in 1000 replicates. The scale on the x-axis represents the estimated branch lengths and numbers indicate the bootstrap values. The GenBank accession numbers for trehalases (protein) are as follows: *Xanthomonas campestris* TRE (YP_362391.1); *Enterobacter* sp. TRE (YP_001177075.1); *Escherichia coli* (EFW73826.1); *Magnaporthe grisea* NTH1 (AAB88889.1); *Drosophila melanogaster* TREa (NP_524821.1); *Erwinia amylovora* TRE (CBX82150.1); *Spodoptera frugiperda* TRE (ACF94698.1); *Homo sapiens* TRE (BAA24381.1); *Ralstonia solanacearum* TRE (YP_003749251.1); *Danio rerio* TRE (XP_001336187.3); *Nicotiana tabacum* TRE1 (BAI63261.1); *Apis mellifera* TRE (BAF81545.1); *Medicago truncatula* TRE1 (ABJ98545.1); *Physcomitrella patens* TRE1 (ABO61746.1); *Caenorhabditis elegans* TRE (CAD54512.1); *Neurospora crassa* NTH1 (CAD36994.1); *Laccaria bicolor* NTH1 (XP_001880715.1); *Laccaria bicolor* ATH1 (EDR13253.1); *Schizosaccharomyces pombe* NTH1 (CAA11904.1); *Neurospora tetrasperma* NTH1 (EGZ75693.1); *Emericella nidulans* NTH1 (AAB99831.1); *Metarhizium acridum* NTH1 (AAS67889.1); *Saccharomyces cerevisiae* ATH1 (CAA58961.1); *Saccharomyces cerevisiae* NTH1 (EDN64617.1); *Candida albicans* NTH1 (CAA64476.1); *Glycine max* TRE1 (NP_001238042.1); *Magnaporthe oryzae* NTH1 (XP_364626.1); *Arabidopsis thaliana* TRE1 (AEE84844.1); *Talaromyces emersonii* ATH1 (AAL33632.1); *Metarhizium anisopliae* ATH1 (ABO93464.1); *Spodoptera exigua* TRE (ABY86218.1); *Rattus norvegicus* TRE (AAC25985.1); *Mus musculus* TRE (AAF61430.1); *Phaseolus vulgaris* TRE1 (LCL_Contig44917).

Determination of *PvTRE1* transcript abundance during nodule development

Since *PvTRE1* is expressed mainly in nodules than roots, we decided to assess *PvTRE1* transcript abundance during nodule ontogeny. We performed nodulation analysis at 14, 21, 25, and 28 dpi in wildtype common bean plants interacting with *R. etli* CFN42. Transcript abundance of *PvTRE1* in nodules remained unchanged from 14 to 21 dpi. At 25 dpi *PvTRE1* transcript abundance underwent a decrease of $16.19 \pm 0.5\%$, relative to 14–21 dpi. However, at 28 dpi a dramatic increase in *PvTRE1* transcripts of up to $264.3 \pm 3.68\%$ (compared with 14–21 dpi; Fig. 2c) was observed. By contrast, *PvTRE1* transcript abundance remained low and constant in the roots at the same time points. In comparison, sucrose synthase (*PvSUS1*) transcript abundance (Silvente *et al.*, 2003) underwent an increase of $40 \pm 1.52\%$ at 21 dpi relative to 14 dpi. At 25 dpi a further increase of $123 \pm 9.8\%$ (compared with 14 dpi) was observed. However, the

PvSUS1 transcript abundance decreased down to $57.9 \pm 1.78\%$ at 28 dpi (relative to 14 dpi), contrary to the pattern observed for *PvTRE1* (mirror-image symmetry).

Carbohydrate profile during common bean nodule development

Soluble carbohydrates, including fructose, glucose, sucrose, and trehalose, were quantified at each step of the nodulation process. Glucose was present at 21 and 25 dpi, with its highest concentration at 25 dpi. Fructose was found only at 21 dpi. Sucrose concentration showed peaks at 21 and 28 dpi, and troughs at 14 and 25 dpi. Trehalose peaked at 25 dpi; however, the lowest trehalose concentrations were detected at 14 and 28 dpi, with similar concentrations at those two points of the nodulation process (Fig. 2d). The trehalose concentration peak at 25 dpi was coincident with the decrease in *PvTRE1* transcript abundance. Interestingly, the highest *PvTRE1* transcript accumulation occurred at

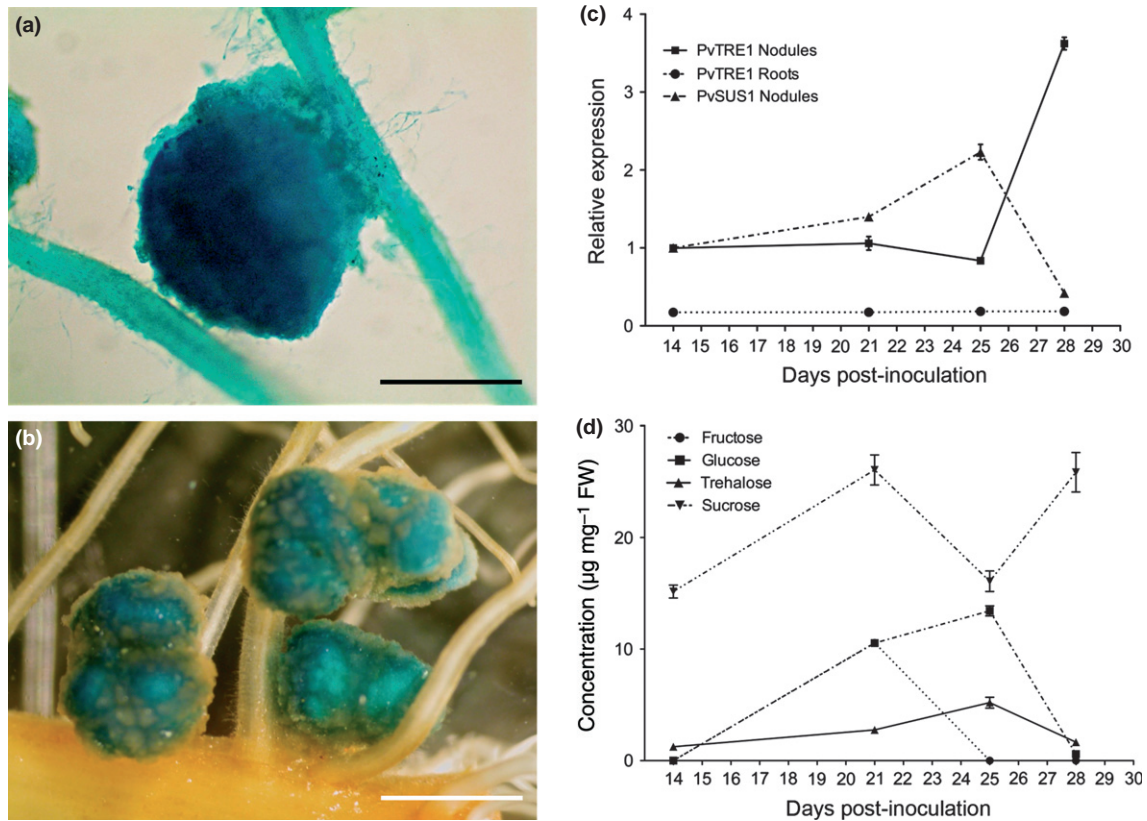


Fig. 2 *PvTRE1* promoter analysis, and *PvTRE1* expression and soluble carbohydrate profile during nodule development. (a) pCaMV35S::GUS expression in transgenic roots of common bean (*Phaseolus vulgaris*). (b) pPvTRE1::GUS expression restricted to nodules in transgenic roots of common bean. (c) *PvTRE1* and *PvSUS1* gene expression profile during nodule development. The results presented for *PvTRE1* and *PvSUS1* expression during nodule development are from six independent ($n = 6$) biological replicates, and are shown as means \pm SD. (d) Soluble carbohydrate (fructose, glucose, sucrose, and trehalose) profile during nodule development. dpi, d postinoculation. Bars, 2 mm. The results presented for soluble carbohydrate quantification during nodule development are means \pm SD from three independent ($n = 3$) experiments.

28 dpi, perfectly matching the lowest trehalose concentration during nodule development (Fig. 2c,d). Overall, the concentrations of the soluble carbohydrates trehalose and sucrose during the nodulation process negatively correlated with the *PvTRE1* and *PvSUS1* transcript abundances, respectively.

Transcript accumulation of genes involved in growth, carbon metabolism and autophagy in loss-of-function *PvTRE1* transgenic nodules

To follow up on the results from the pPvTRE1::GUS expression, *PvTRE1* transcript abundance, and soluble carbohydrate profile experiments, *PvTRE1* gene silencing by RNA interference (RNAi) was performed in order to explore the role of this gene in nodule development and physiology. Composite common bean plants expressing the *PvTRE1*-RNAi construct (pTdT-*PvTRE1*-RNAi) were generated and hairy roots were inoculated with *R. etli* CFN42 (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). *PvTRE1* transcript abundances were determined at 21 dpi by qRT-PCR in nodules expressing the RNAi construct, as well as in those from control lines (K599 and pTdT-DC-RNAi). *PvTRE1* transcript abundances were reduced (Fig. 3a) up to $81.9 \pm 0.37\%$ in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules, as compared with transgenic

nodules harboring a control RNAi construct (pTdT-GUS-RNAi, unable to silence any endogenous gene), and nodules from K599 hairy roots. In these latter two controls, *PvTRE1* transcript abundance was quite similar (Fig. S2c). We also assessed transcript accumulation of genes involved in growth and carbon metabolism (*PvSUS1*, *PvHXX1* (hexokinase), *PvTOR* (target of rapamycin), *PvSnRK1* (Sugar non-fermentable related kinase1)) and autophagy (*PvATG3* (autophagy related gene 3), *PvBeclin* (Beclin or autophagy related gene 6)) in the *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules. Down-regulation of *PvTRE1* inversely correlated with increased transcript abundance of *PvSUS1*, *PvHXX1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*, and *PvATG3* (Fig. 3b), whereas *PvBeclin* remained without significant change.

Down-regulation of *PvTRE1* transcript abundance leads to alteration in bacteroid morphology

Nodule structure and bacteroid morphology were analyzed by optical microscopy and TEM, respectively. At the optical microscopy level, we did not observe obvious morphological differences in sections of *PvTRE1*-RNAi nodules stained with toluidine blue compared with control nodules (K599, pTdT-DC-RNAi; Fig. 4a,c). To assess the effects of *PvTRE1* silencing on bacteroid

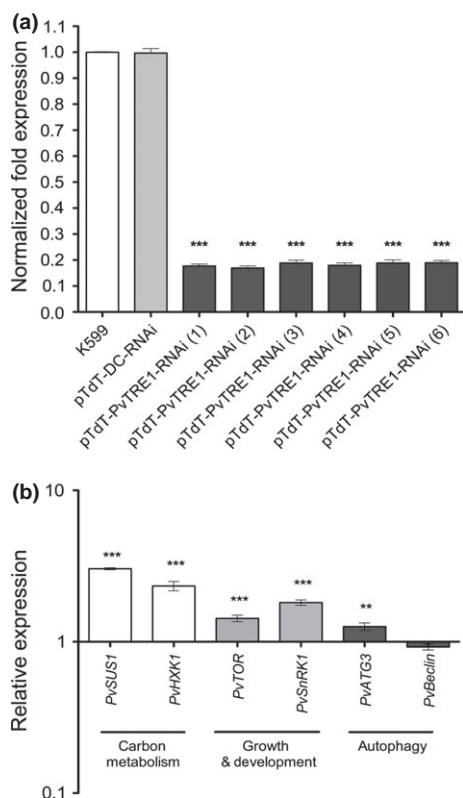


Fig. 3 Down-regulation of *PvTRE1* and up-regulation of genes involved in carbon metabolism, growth and development, and autophagy in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules. (a) Down-regulation of *PvTRE1* in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules. The results of down-regulation of *PvTRE1* in *PvTRE1*-RNAi nodules are from six independent ($n = 6$) transgenic roots from composite common bean (*Phaseolus vulgaris*) plants; numbers in brackets indicate the composite common bean plants used in this study, and the statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test (***, $P < 0.001$), and shown as means \pm SD. (b) Expression of genes involved in growth and carbon metabolism (*PvSUS1*, *PvHXK1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*), and autophagy (*PvATG3*, *PvBeclin1*); data are expressed as \log_{10} of relative gene expression of the K599 controls, and shown as means \pm SD. The results of genes involved in growth and carbon metabolism, and autophagy from *PvTRE1*-RNAi nodules are from six independent ($n = 6$) transgenic roots from composite common bean plants, and statistical significance was determined using an unpaired two-tailed Student's *t*-test (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

morphology, we analyzed ultrathin nodule sections using TEM. There was an electron-dense zone surrounding bacteroids in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodule sections, which was labeled as 'electron-dense boundary' (edb) (Fig. 4i); this structure was absent in bacteroids of control nodule sections (Fig. 4g,h). In addition, the number of bacteroids per visual camp ($577.5 \mu\text{m}^2$) in *PvTRE1*-silenced nodules (Fig. 4f) was increased ($36 \pm 2.11\%$) with respect to those in control nodules (K599, pTdT-DC-RNAi; Figs 4d–e, S3).

Down-regulation of *PvTRE1* has a direct influence on nodule trehalose concentrations, bacterial viability, nitrogen assimilation, and nodule biomass

The trehalose content of *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules was increased by $78.0 \pm 5.72\%$ compared with that in control

nodules (K599, pTdT-DC-RNAi; Fig. 5a). By contrast, sucrose was decreased up to $19.90 \pm 4.98\%$ in *PvTRE1*-RNAi nodules compared with control nodules (K599, pTdT-DC-RNAi; Fig. 5a). There were no significant differences in the fructose and glucose contents between *PvTRE1*-RNAi and control nodules (K599, pTdT-DC-RNAi; Fig. 5a). The soluble carbohydrate profile was assessed by HPLC at 21 dpi. In order to ensure that trehalose concentrations were accurately quantified, we included maltose as an internal control to assess the retention times of this soluble carbohydrate and trehalose, as both disaccharides are formed from two glucose molecules linked by a glycosidic bond: α, α -1,4 for maltose and α, α -1,1 for trehalose. The retention time for maltose was 15.8 min, and for trehalose it was 18.8 min (Fig. 5a, upper inset).

To determine the effect on bacterial survival of down-regulation of *PvTRE1*, *Rhizobium* bacteria were reisolated from *PvTRE1*-RNAi and control nodules. CFUs recovered from *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules (Fig. 5b) were almost one order of magnitude higher than those from control nodules (K599, pTdT-DC-RNAi). In addition, we determined the nitrogenase activity in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules and control nodules (K599, pTdT-DC-RNAi). The *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules displayed $71.01 \pm 7.19\%$ more nitrogenase activity than control nodules (Fig. 5c). Just as acetylene reduction is indicative of nitrogenase activity in bacteroids, the increase in transcript accumulation of genes involved in nitrogen assimilation (*GOGAT* (*NADH-Glutamate synthase II*)) provides information about the amount of fixed nitrogen mobilized into plant cells (Silvente *et al.*, 2002; Cordoba *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2008). *GOGAT* transcript abundance was increased in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules by $82 \pm 0.02\%$ compared with that of control nodules (Fig. 5d). By contrast, *GS* (*glutamine synthetase*) transcript accumulation did not show any significant change between *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules and control nodules (Fig. S4b). We also quantified nodule biomass, as it is indicative of the amount of carbon allocated to nodule cells. The net nodule DW, or biomass, of *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules increased threefold (Fig. 5e) compared with control nodules, without a significant increase in nodule number (Fig. S4a).

PvTRE1 down-regulation in nodules does not have negative side-effects compared with leaves of composite common bean plants

As *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules exhibited changes in the content of soluble carbohydrates (sucrose and trehalose), nodule biomass, bacterial survival, nitrogen fixation, and nitrogen assimilation, we assessed the trehalose content in leaves of the composite common bean plants (Fig. 6a). Interestingly, in leaves of composite plants with *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules, trehalose was increased by $27.32 \pm 3.40\%$ compared with leaves of control composite plants (K599, pTdT-DC-RNAi). However, sucrose, fructose, and glucose contents in leaves of plants with *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules did not show any significant changes compared with control plants (K599, pTdT-DC-RNAi;

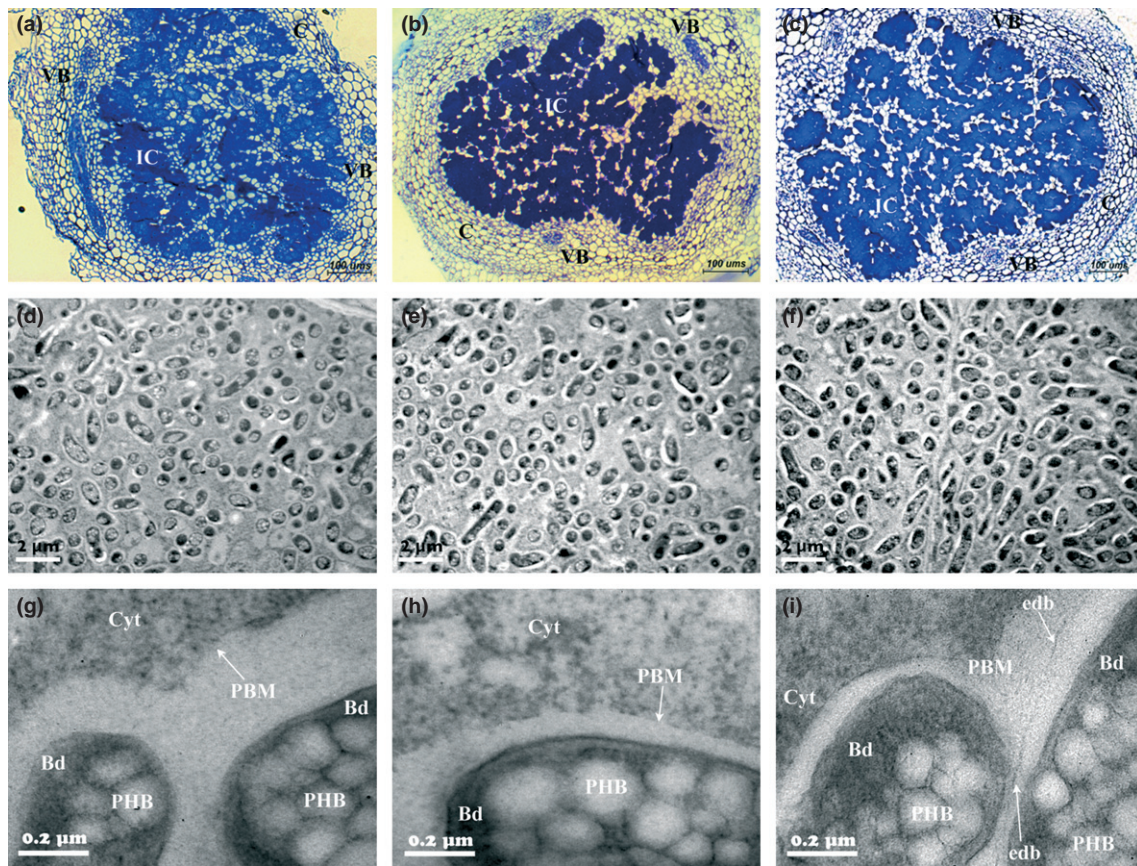


Fig. 4 Structure of *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules in *Phaseolus vulgaris*. (a–c) Optical microscopy of a K599 (a), a pTdT-DC-RNAi (b), and a *PvTRE1*-RNAi (c) nodule. (d–i) Transmission electron microscopy of bacteroids in K599 nodules (d, g), pTdT-DC-RNAi nodules (e, h), and *PvTRE1*-RNAi nodules (f, i). Representative results are shown. VB, vascular bundle; C, cortex; IC, infected cells; Bd, bacteroids; Cyt, cytoplasm; PHB, poly-β-hydroxybutyrate; edb, electrodense boundary; PBM, peribacteroid membrane.

Fig. 6a). In addition, *PvTRE1* transcript accumulation in leaves did not show any significant change.

Leaf biomass in composite common bean plants with *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules (Fig. 6d) was comparable to that of control plants (K599, pTdT-DC-RNAi). Additionally, leaf area measurements did not reveal any negative effect of *PvTRE1*-RNAi nodules on leaf biomass (Fig. 6e).

Discussion

Herein the complete sequence of the trehalase gene (*PvTRE1*) found in the common bean genome (Phytozome v8.0 and Mazorka) was obtained and compared with homologous plant (*GmTRE1*) and *E. coli* (*EcTRE*) trehalase genes. Prediction of the three-dimensional structure of the encoded protein based on the known structure of the *E. coli* homolog led us to designate this gene *PvTRE1*. The structural analysis revealed a high degree of conservation, and moreover, they are grouped (Fig. 1) with other plant trehalases, suggesting a high degree of sequence conservation and perhaps of structure/function identity among plant trehalases, as was reported for trehalases from insects and fungi, and other phylogenetic groups (Doehlemann *et al.*, 2006; Lunn, 2007; Silva *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). The *PvTRE1* gene

structure consists of 10 exons and nine introns, similar to the gene structure of *GmTRE1* and *MtTRE1*, both of which have 11 exons and 10 introns, and different from *AtTRE1*, which contains six exons and five introns (Fig. S1a). Furthermore, in nodulated roots, the expression of *PvTRE1* was restricted mainly to nodules, which resembled the expression of nodulin genes, for example, *leghemoglobin A* and *sucrose synthase*. Nodule-enhanced expression of *PvTRE1* (Fig. 2a,b) suggests that *PvTRE1* could have an active role in carbon metabolism in nodules, as previously suggested for its homolog (*GmTRE1*) in soybean (Aeschbacher *et al.*, 1999).

PvTRE1 transcript accumulation in roots was lower than that in nodules, but remained constant throughout nodule ontogeny. By contrast, the *PvTRE1* transcript accumulation profile in nodules was inversely proportional to trehalose concentration during nodule development, and it is worth noting that the highest *PvTRE1* transcript accumulation coincided with the beginning of nodule senescence, correlating with the up-regulation of *AtTRE1* during senescence in *Arabidopsis* (Fernandez *et al.*, 2010). Interestingly, *PvSUS1* transcript accumulation paralleled trehalose content (Fig. S2b) and was opposite to accumulation of the *PvTRE1* transcript (Fig. 2c). This supports the idea that *PvTRE1* regulates trehalose content, as inhibition of trehalase activity by

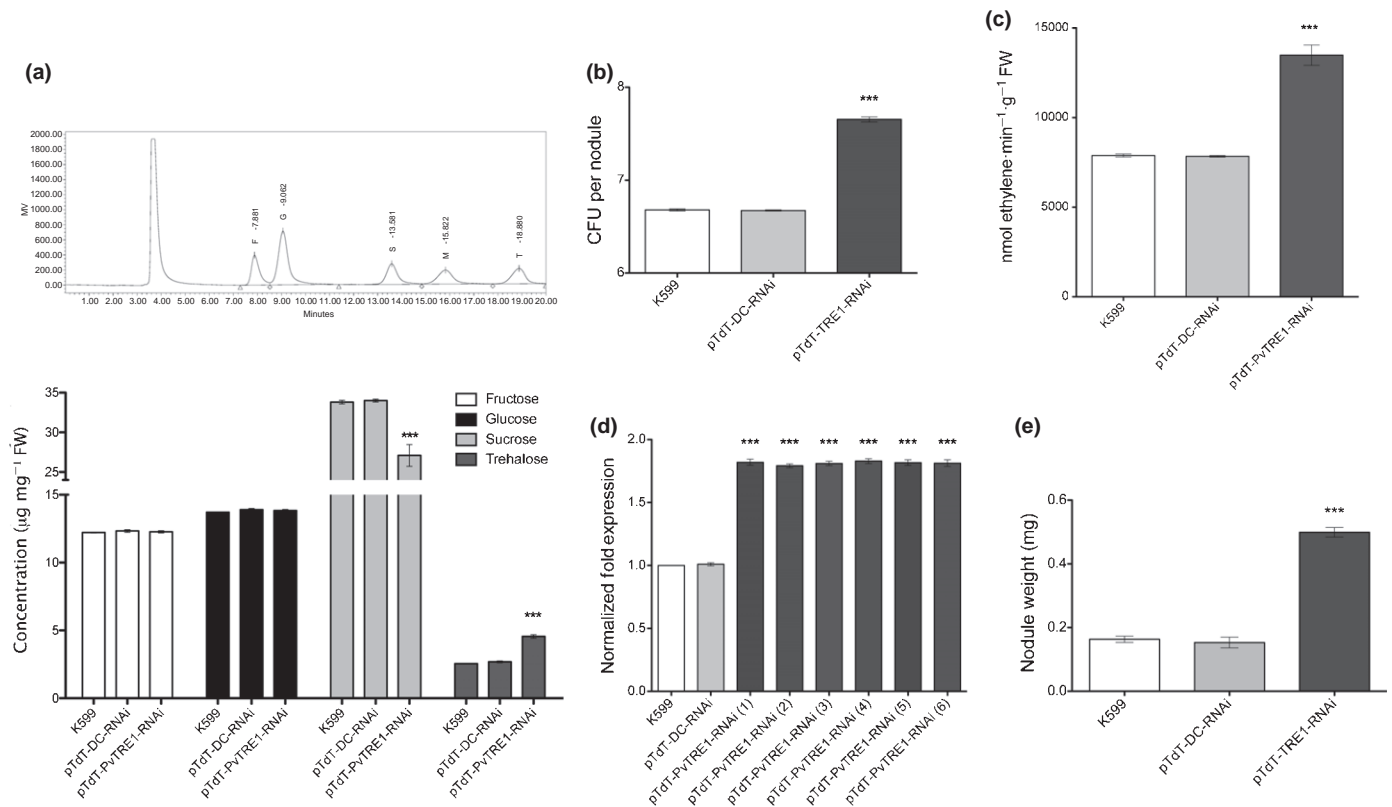


Fig. 5 Effects of *PvTRE1* down-regulation in nodules of *Phaseolus vulgaris*. (a) Quantification of soluble carbohydrates (fructose, glucose, sucrose, and trehalose) in *PvTRE1*-RNAi nodules. The results presented for soluble carbohydrate quantification in *PvTRE1*-RNAi nodules are means \pm SD from three independent ($n = 3$) composite plants, and statistical significance was determined with one-way ANOVA followed by Dunnett's test (***, $P < 0.001$). (b) Bacterial survival determined by CFUs of *Rhizobium* reisolated from *PvTRE1*-RNAi nodules. The results presented for CFUs are means \pm SD from three independent ($n = 3$) composite plants, and statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test (***, $P < 0.001$). (c) Nitrogenase activity in *PvTRE1*-RNAi nodules. The results for nitrogenase activity are means \pm SD from three independent ($n = 3$) composite plants, and statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test (***, $P < 0.001$). (d) *GOGAT* (*NADH-Glutamate Synthase II*) expression in *PvTRE1*-RNAi nodules. The results for *GOGAT* expression are means \pm SD from six independent ($n = 6$) composite plants, and statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test (***, $P < 0.001$). The number in brackets indicates the independent transgenic roots from composite common bean plants analyzed. (e) Biomass of *PvTRE1*-RNAi nodules. The results for nodule biomass are means \pm SD from three independent ($n = 3$) composite plants, and statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test (***, $P < 0.001$).

addition of validamycin A in nodules resulted in trehalose accumulation (López *et al.*, 2009). Additionally, it seems that trehalose content influences *PvSUS1* expression directly, which is consistent with a previous report that addition of trehalose into nonnodulated soybean roots strongly induces sucrose synthase activity, and trehalose inhibition by validamycin A leads to a decrease in sucrose content (Müller *et al.*, 1995, 1998).

We decided to assess the impact of trehalose on nodule physiology by down-regulating *PvTRE1* expression via RNAi in common bean composite plants. The resulting 82% decrease in *PvTRE1* transcript (Fig. 3a) accumulation seems to have a higher impact on trehalose content (78% increase; Fig. 5a) than that attained by inhibiting trehalase activity with validamycin A in soybean nodules; this led to a 73% inhibition of enzyme activity but only a 46% increase in trehalose (Müller *et al.*, 1995). In addition to the significant enhancement of trehalose content in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules, the expression of genes directly involved in growth and carbon metabolism (*PvSUS1*, *PvHXX1*, *PvTOR*, *PvSnRK1*) and autophagy (*PvATG3*) were

also increased (Fig. 3b), suggesting that the up-regulation was triggered by *PvTRE1* down-regulation, which in turn gave rise to a higher trehalose content. The increase in transcript accumulation for sucrose synthase (203%) and hexokinase (134%) reflects an enhancement in carbon assimilation, most probably driven by an increased rate of sucrose degradation, as evidenced by the specific decrease in sucrose in these nodules without any significant changes in soluble fructose and glucose concentrations (Fig. 5a; Müller *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2003). Furthermore, the increase in *PvTOR* (43%), *PvSnRK1* (81%), and *PvATG3* (26%) transcript (Fig. 3b) accumulation suggests a direct positive impact on autophagy and cellular cytoplasm recycling, as these genes are actively involved in regulating cell development and protein turnover. Previously, it has been reported that trehalose can induce autophagy (trehalose-dependent autophagy) by a target of rapamycin (TOR)-independent pathway, suggesting that plant and animal cells possess similar mechanisms to promote cellular recycling instead of triggering programmed cell death (Sarkar *et al.*, 2007; Aguib *et al.*, 2009;

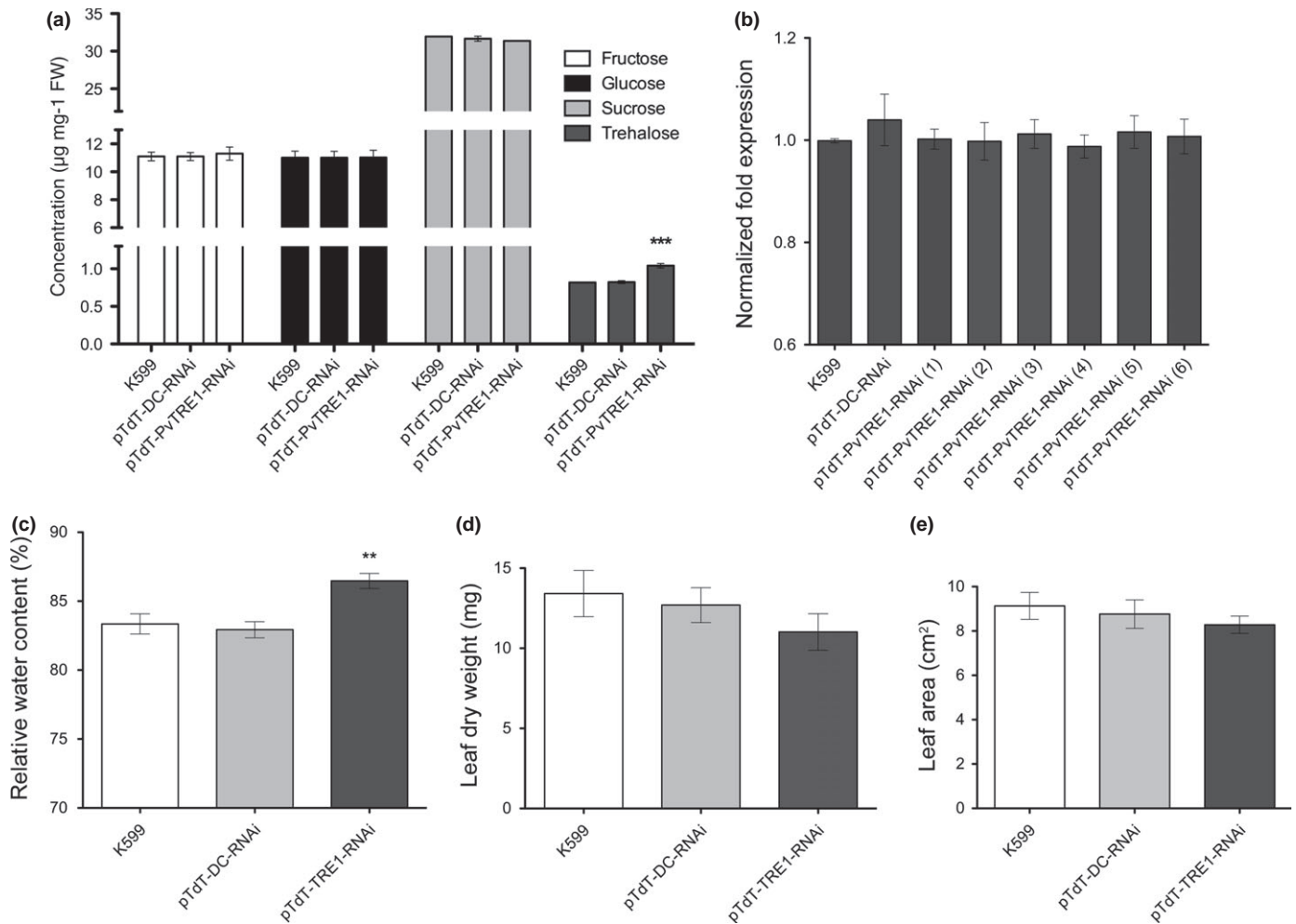


Fig. 6 Effects on leaves of composite common bean (*Phaseolus vulgaris*) plants with *PvTRE1*-RNAi nodules. (a) Soluble carbohydrate (fructose, glucose, sucrose, and trehalose) quantification in leaves of composite plants. The results presented for soluble carbohydrate quantification in leaves of composite plants are means \pm SD from three independent ($n = 3$) composite plants, and statistical significance was determined with one-way ANOVA followed by Dunnett's test (***, $P < 0.001$). (b) *PvTRE1* transcript accumulation in leaves of composite plants. The results for *PvTRE1* expression are from six independent ($n = 6$) composite plants; statistical analysis was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test, and results are shown as means \pm SD. The number in brackets indicates the number of independent composite common bean plants analyzed. (c) Relative water content (RWC) of leaves of composite plants. The results for RWC are means \pm SD from three independent ($n = 3$) composite plants, and statistical analysis was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test (**, $P < 0.01$). (d) Leaf DW of composite plants. The results for leaf DW are means \pm SD from three independent ($n = 3$) composite plants, and statistical analysis was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test. (e) Leaf area of composite plants. The results for leaf area are means \pm SD from three independent ($n = 3$) composite plants and statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test.

Jossier *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Casarejos *et al.*, 2011; Hofius *et al.*, 2011).

The accumulation of trehalose, mediated by *PvTRE1* down-regulation, triggered sucrose degradation and increased bacterial survival, nodule biomass, nitrogen fixation, and *GOGAT* transcript accumulation (Fig. 5). The enhanced bacterial proliferation inside nodules could be fueled by the trehalose accumulation and its translocation from the infected cells to *Rhizobium*. *Rhizobia* possess two operons and two genes directly involved in trehalose transportation and assimilation (*thuEFGK*, *aglEFGAK*, *thuA*, *thuB*) mainly induced by trehalose (Jensen *et al.*, 2002, 2005; Ampomah *et al.*, 2008; Schmeisser *et al.*, 2009), suggesting that the trehalose-processing metabolism could be active in bacteroids. Furthermore, the increased trehalose in nodules not

only triggered an increase in nodule biomass, but also had a positive impact on trehalose accumulation in leaves. This suggests a systemic effect of trehalose accumulation in nodules, as the plant is only partially genetically modified: only the roots and nodules are transgenic. The trehalose content in leaves was increased by *c.* 27%, without any detriment to leaf area or leaf DW (net biomass; Fig. 6a,d,e). The increased trehalose in leaves could be a result of the mobilization of this disaccharide from nodules to leaves, as previously reported and suggested to occur in seeds from common bean plants inoculated with *Rhizobium* (Altamirano-Hernández *et al.*, 2007). Therefore, this could suggest that there is direct bidirectional transport of disaccharides between nodules and leaves in common bean plants during symbiosis. In addition, the accumulation of trehalose caused by

down-regulating *PvTRE1* in nodules led to an increased proliferation of bacteroids (by almost one order of magnitude), the enhancement of nitrogen fixation (70%) and a higher nodule biomass (threefold). It is worth noting that increased nodule biomass and bacteroid proliferation did not have a negative effect on leaf area or leaf biomass. In supernodulating legumes, a negative impact has been observed on the aerial part of the plant (length and biomass reduced). Interestingly, this increase in nodule number does not lead to higher nitrogen fixation rates (Penmetsa *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2010). Thus, *PvTRE1* down-regulation in nodules leads to an increase in carbon consumption, reflected in enhanced nodule biomass, and in turn an increased trehalose content in nodules as well as in leaves. Trehalose is known to play a central role in the regulation of sucrose content in plant cells (Lunn, 2008; Paul, 2008; Schlupepmann & Paul, 2009). The results obtained in this work suggest that trehalose is able to induce *PvSUS1* expression for sucrose degradation, and to regulate the sucrose content in plant cells (Müller *et al.*, 1998; Schlupepmann *et al.*, 2003, 2004; Gómez *et al.*, 2006; Ramon & Rolland, 2007). Altogether, the data suggest that by modifying the trehalose content in nodules, it is possible to alter metabolic carbohydrate flux, changing the sink-and-source state of these organs (Schlupepmann & Paul, 2009).

Interestingly, changes in the bacteroid number and morphology of the bacteroids inside these nodules, including an edb structure surrounding the bacteroids (Fig. 4i), were observed. These effects could be derived from carbohydrates, as previously reported for another *Rhizobium* species (Fernandez-Aunión *et al.*, 2010). The modification of the trehalose content in *Rhizobium* by the overexpression or mutation of a trehalose biosynthesis (*OtsA*) gene directly affected the distribution of infected cells inside the nodules, and triggered the expression of several genes involved in nitrogen assimilation, carbon assimilation, oxygen transport, and hydrogen peroxide or reactive oxygen species detoxification in common bean during the symbiotic interaction, which gave rise to improvements in grain yield, nitrogen fixation, and stress tolerance (Suárez *et al.*, 2008). These findings strongly suggest that modification of the trehalose content in the nodules triggers physiological alterations that enhance carbon and nitrogen metabolism, as well as bacteroid fitness (greater survival) and nitrogen fixation, which in turn positively impact the symbiotic interaction. Finally, we propose that breeding for the genetic modification of trehalose degradation in nodules could be a valuable mechanism for improving agricultural symbiotic nitrogen fixation.

Conclusion

PvTRE1 down-regulation in common bean nodules was achieved using RNAi technology, giving rise to a 78% increase in trehalose accumulation. The resulting enhancement in nodule biomass and bacterial proliferation strongly supports a central and active role for trehalose in orchestrating carbon metabolism in plant cells. In spite of the nodule biomass increase, there was no detrimental effect on leaf area or leaf biomass. Since *PvTRE1* down-regulation has a remarkably positive effect on the symbiosis, this

approach could represent a new promising and viable strategy for genetic screening of trehalase mutants that could enhance symbiotic nitrogen fixation.

Acknowledgements

We thank Olivia Santana, Noreide Nava, Fernando Gonzalez, Maria Luisa Tabche-Barrera, José Alberto Hernández-Eligio, Guadalupe Zavala, Xochitl Alvarado-Affantranger, and Ana Isabel Bieler for technical advice and the use of equipment at the Instituto de Biotecnología and Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, and Paul Gaytán, Jorge Yañez and Eugenio López for primer synthesis and DNA sequencing at the Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by grant nos 83324 and 177744 from CONACyT, and PAPIIT no. IN222012. A.B. was supported by a PhD scholarship (169219) from CONACyT.

References

- Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A. 1999. Purification of the trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. GMTRE1 is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiology* 119: 489–495.
- Aguib Y, Heiseke A, Gilch S, Riemer C, Baier M, Schätzl H, Ertmer A. 2009. Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy* 5: 1–9.
- Altamirano-Hernández J, López MG, Acosta-Gallegos JA, Fariás-Rodríguez R, Peña-Cabriales JJ. 2007. Influence of soluble sugars on seed quality in nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): the case of trehalose. *Crop Science* 47: 1193–1205.
- Ampomah OY, Jensen JB, Bhuvanawari TV. 2008. Lack of trehalose catabolism in *Sinorhizobium* species increases their nodulation competitiveness on certain host genotypes. *New Phytologist* 179: 495–504.
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G. 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology* 6: 109.
- Blanco L, Reddy PM, Silvente S, Bucciarelli B, Khandual S, Alvarado-Affantranger X, Sanchez F, Miller S, Vance C, Lara-Flores M. 2008. Molecular cloning, characterization and regulation of two different NADH-glutamate synthase cDNAs in bean nodules. *Plant, Cell & Environment* 31: 454–472.
- Blanco FA, Meschini EP, Zanetti ME, Aguilar OM. 2009. A Small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-*Rhizobium* symbiotic association. *The Plant Cell* 21: 2797–2810.
- Brechenmacher L, Lei Z, Libault M, Findley S, Sugawara M, Sadowsky MJ, Sumner LW, Stacey G. 2010. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology* 153: 1808–1822.
- Brodmann D, Schuller A, Ludwig-Müller J, Aeschbacher RA, Wiemken A, Boller T, Winkler A. 2002. Induction of trehalase in Arabidopsis plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 693–700.
- Casarejos MJ, Solano RM, Gómez A, Perucho J, de Yébenes JG, Mena MA. 2011. The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. *Neurochemistry International* 58: 512–520.
- Chen J, Tang B, Chen H, Yao Q, Huang X, Chen J, Zhang D, Zhang W. 2010. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE* 5: e10133.
- Cordoba E, Shishkova S, Vance CP, Hernández G. 2003. Antisense inhibition of NADH glutamate synthase impairs carbon/nitrogen assimilation in nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Plant Journal* 33: 1037–1049.

- DeLano WL. 2002. *The PyMol molecular graphics system*. San Carlos, CA, USA: DeLano scientific.
- Doehlemann G, Berndt P, Hahn M. 2006. Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* 152: 2625–2634.
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares J-E, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sánchez F. 2007. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. By *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* 2: 1819–1824.
- Fariás-Rodríguez R, Mellor RB, Arias C, Peña-Cabriales JJ. 1998. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiologia Plantarum* 102: 353–359.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff PM. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 61–76.
- Fernandez O, Béthencourt L, Quero A, Sangwan RS, Clément C. 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *TRENDS in Plant Science* 15: 409–417.
- Fernandez-Aunión C, Hamouda TB, Iglesias-Guerra F, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Aouani ME, Vargas C. 2010. Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiology* 10: 192.
- Foster AJ, Jenkinson JM, Talbot NJ. 2003. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The EMBO Journal* 22: 225–235.
- Fougère F, Le Rudulier D, Streeter JG. 1991. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 96: 1228–1236.
- Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 280–300.
- Gibson RP, Gloster TM, Roberts S, Warren RAJ, Storch de Gracia I, García A, Chiara JL, Davies GJ. 2007. Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* 46: 4115–4119.
- Gómez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, Graham IA. 2006. Delayed embryo development in the ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 Mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *The Plant Journal* 46: 69–84.
- Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872–877.
- Hofius D, Munch D, Bressendorff S, Mundy J, Petersen M. 2011. Role of autophagy in disease resistance and hypersensitive response-associated cell death. *Cell Death and Differentiation* 18: 1257–1262.
- Jensen JB, Ampomah OY, Darrah R, Peters NK, Bhuvaneshwari TV. 2005. Role of trehalose transport and utilization in *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 694–702.
- Jensen JB, Peters NK, Bhuvaneshwari TV. 2002. Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 184: 2978–2986.
- Jossier M, Bouly J-P, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Hardie DG, Thomas M. 2009. SnRK1 (SNF1-related Kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 59: 316–328.
- Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Hilson P. 2007. Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiology* 145: 1183–1191.
- Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M. 2010. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbiosis underground. *Plant Cell Physiology* 51: 1381–1397.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402–408.
- López M, Herrera-Cervera JA, Iribarne C, Tejera NA, Lluch C. 2008. Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: nodule carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* 165: 641–650.
- López M, Tejera NA, Lluch C. 2009. Validamycin A improves the response of *Medicago truncatula* plants to salt stress by inducing trehalose accumulation in the root nodules. *Journal of Plant Physiology* 166: 1218–1222.
- Lunn JE. 2007. Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Functional Plant Biology* 34: 550–563.
- Lunn JE. 2008. *Sucrose metabolism*. eLS. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Chen W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332–336.
- Müller J, Aeschbacher RA, Winkler A, Boller T, Wiemken A. 2001a. Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125: 1086–1093.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 1995. Effects of validamycin A, a potent trehalase inhibitor, and phytohormones on trehalose metabolism in roots and root nodules of soybean and cowpea. *Planta* 197: 362–368.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 1998. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *Journal of Plant Physiology* 153: 255–257.
- Müller J, Boller T, Wiemken A. 2001b. Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *Journal of Experimental Botany* 52: 943–947.
- Nehls U. 2008. Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *Journal of Experimental Botany* 59: 1097–1108.
- Ocón A, Hampp R, Requena N. 2007. Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 174: 879–891.
- Paul MJ. 2008. Trehalose 6-phosphate: a signal of sucrose status. *Biochemical Journal* 412: e1–e2.
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang Y. 2008. Trehalose metabolism and signaling. *The Annual Review of Plant Biology* 59: 417–441.
- Penmettsa RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR, Cook DR. 2003. Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131: 998–1008.
- Pontius JU, Wagner L, Schuler GD. 2003. UniGene: an unified view of the transcriptome. In: McEntyre J, Ostell J, eds. *The NCBI handbook*. Bethesda, MD, USA: National Center for Biotechnology Information, 1–11.
- Ramírez M, Graham MA, Blanco-López L, Silvente S, Medrano-Soto A, Blair MW, Hernández G, Vance CP, Lara M. 2005. Sequencing and analysis of common bean ESTs. Building a foundation for functional genomics. *Plant Physiology* 137: 1211–1227.
- Ramon M, Rolland F. 2007. Plant development: introducing trehalose metabolism. *TRENDS in Plant Science* 12: 185–188.
- Salmiminen SO, Streeter JG. 1992. Labeling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* bacteroids following incubation of intact nodules with ¹⁴CO₂. *Plant Physiology* 100: 597–604.
- Sánchez-López R, Jáuregui D, Nava N, Alvarado-Affantranger X, Montiel J, Santana O, Sanchez F, Quinto C. 2011. Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant, Cell & Environment* 34: 2109–2121.
- Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. 2007. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant Huntingtin and α -Synuclein. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 5641–5652.
- Schluepmann H, Van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul MJ, Smeekens S. 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology* 135: 879–890.
- Schluepmann H, Paul M. 2009. Trehalose metabolites in Arabidopsis – elusive, active and central. In: Last R, Chang C, Jander G, Kliebenstein D, McClung R, Millar H, Torii K, Wagner D, eds. *The Arabidopsis book*. Washington, DC, USA: American Society of Plant Biologists, 1–17.
- Schluepmann H, Pellny TK, Van Dijken A, Smeekens S, Paul MJ. 2003. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 100: 6849–6854.
- Schmeisser C, Liesegang H, Krysiak D, Bakkou N, Le Quére A, Wollherr A, Heinemeyer I, Morgenstern B, Pommerening-Röser A, Flores M *et al.* 2009. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 4035–4045.

- Schnabel E, Mukherjee A, Smith LS, Kassaw T, Long SR, Frugoli JA. 2010. The *ls* supernodulation mutant of *Medicago truncatula* reduces expression of the *SUNN* gene. *Plant Physiology* 154: 1390–1402.
- Silva MCP, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C. 2009. Sequencing of *Spodoptera frugiperda* midgut trehalases and demonstration of secretion of soluble trehalase by midgut columnar cells. *Insect Molecular Biology* 18: 769–784.
- Silvente S, Blanco-López L, Camas A, Ortega J-L, Ramírez M, Lara M. 2002. *Rhizobium etli* mutant modulates carbon and nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 728–733.
- Silvente S, Camas A, Lara M. 2003. Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L.): evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene. *Journal of Experimental Botany* 54: 749–755.
- Streeter JG. 1987. Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiology* 85: 768–773.
- Streeter JG. 2003. Effects of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Journal of Applied Microbiology* 95: 484–491.
- Suárez R, Wong A, Ramírez M, Barraza A, MdC Orozco, Cevallos MA, Lara M, Hernández G, Iturriaga G. 2008. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 958–966.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Valdés-López O, Arenas-Huertero C, Ramírez M, Girard L, Sánchez F, Vance CP, Reyes JL, Hernández G. 2008. Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant, Cell & Environment* 31: 1834–1843.
- Van Dijken A, Schluepmann H, Smeekens S. 2004. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiology* 135: 969–977.
- Vauclaire P, Bligny R, Gout E, De Meuron V, Widmer F. 2010. Metabolic and structural rearrangement during dark-induced autophagy in soybean (*Glycine max* L.) nodules: an electron microscopy and ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Planta* 231: 1495–1504.
- Vessey JK. 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defence of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil* 158: 151–162.
- Wang X, Fan H, Ying Z, Li B, Wang H, Wang G. 2009. Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neuroscience Letters* 469: 112–116.
- Wilson RA, Gibson RP, Quispe CF, Littlechild JA, Talbot NJ. 2010. An NADPH-dependent genetic switch regulates plant infection by the rice blast fungus. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 107: 21902–21907.
- Xie Z-P, Staehelin C, Broughton WJ, Wiemken A, Boller T, Müller J. 2003. Accumulation of soluble carbohydrates, trehalase and sucrose synthase in effective (Fix+) and ineffective (Fix-) nodules of soybean cultivars that differentially nodulate with *Bradyrhizobium japonicum*. *Functional Plant Biology* 30: 965–971.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 *PvTRE1* gene structure and promoter analysis, and *PvTRE1* expression in nodulated roots, is mainly restricted to nodules.

Fig. S2 *PvTRE1* expression level analysis in several organs of common bean, correlation between sucrose synthase expression and trehalose content; and *GUS* transcript accumulation in control nodules.

Fig. S3 Effect of *PvTRE1* silencing on bacteroids, and bacteroid counting per visual camp in TEM micrographs.

Fig. S4 Nodule number in *PvTRE1*-RNAi transgenic roots, and *GS* expression in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules.

Table S1 List of oligonucleotides used for qRT-PCR

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



New Phytologist
Tansley Medal
For excellence in plant science

Full details, terms and conditions at:
www.newphytologist.org

Calling all early stage career scientists!

Deadline for submissions for 2013: 15 December 2012

Win £2000 (GBP) and have your work highlighted in *New Phytologist*, one of the world's leading plant science journals (2011 Impact Factor 6.645).

- The New Phytologist Tansley Medal is awarded annually in recognition of an outstanding contribution to research in plant science
- This is a global competition open to all plant scientists in the early stages of their career and includes both student and post-doctoral researchers with up to five years experience, excluding career breaks, since gaining/defending their PhD
- Selection is based on a two-stage process:
 - **Stage 1)** Submit your CV, a personal statement and reference: Deadline 15 December 2012
 - **Stage 2)** Submission of a single-authored minireview intended for publication: Deadline: 31 March 2013
- All competition articles that are accepted after peer review will be published in *New Phytologist* and the Tansley medal winner selected by the judges from these final papers.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

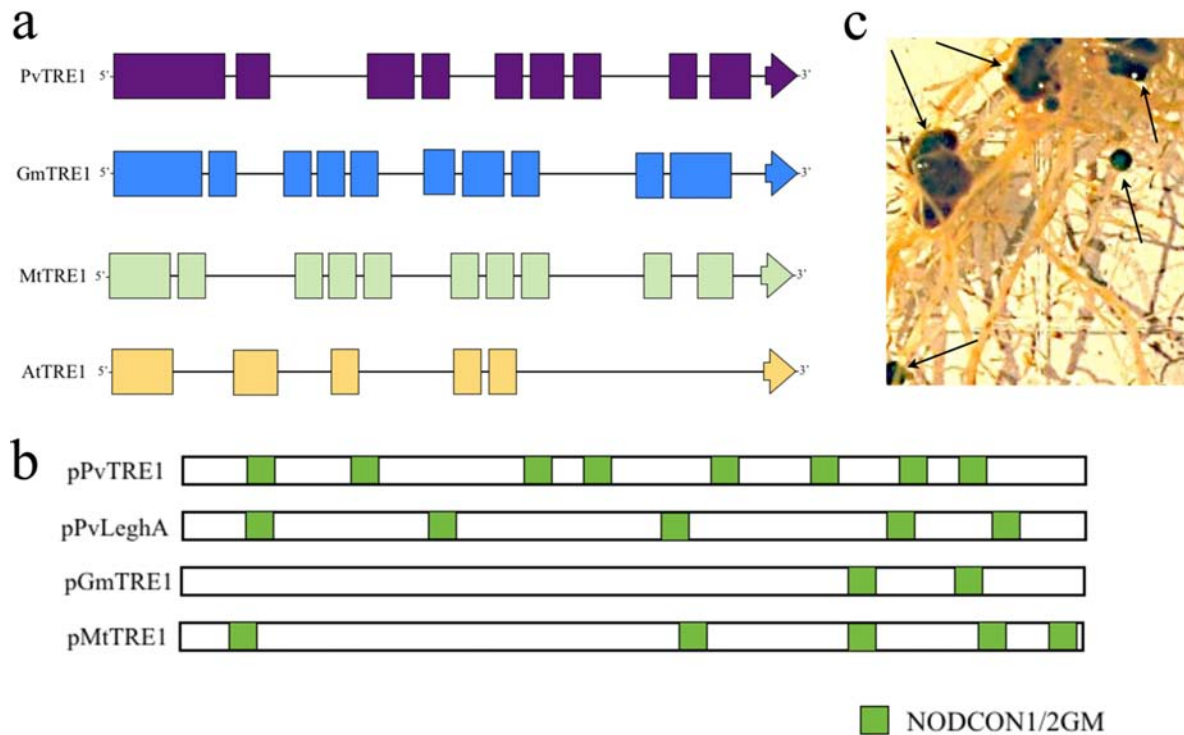


Fig. S1. *PvTRE1* gene structure and promoter analysis, and *PvTRE1* expression in nodulated roots, is mainly restricted to nodules. a) Schematic representation of the gene structure of *PvTRE1* (scaffold00002), *GmTRE1* (Glyma05g36580), *MtTRE1* (contig_53954), and *AtTRE1* (AT4G24040). b) Schematic representation of promoter region sequences of *PvTRE1* (pPvTRE1), *PvLeghA* (pPvLeghA), *GmTRE1* (pGmTRE1), and *MtTRE1* (pMtTRE1) displaying nodule regulatory motifs present. c) Survey of transgenic nodules harboring pPvTRE1::GUS that shows the restriction of the *PvTRE1* expression to the nodules.

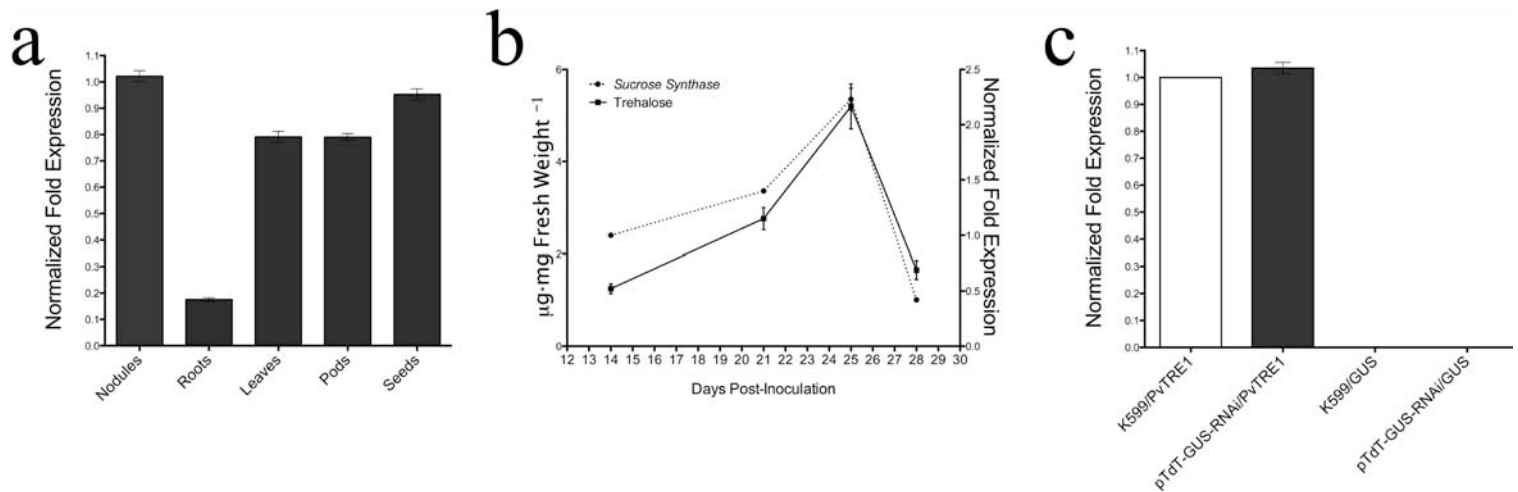


Fig. S2. *PvTRE1* expression level analysis in several organs of common bean, correlation between sucrose synthase expression and trehalose content; and *GUS* transcript accumulation in control nodules. a) Determination of *PvTRE1* expression in several organs (nodules, roots, leaves, pods, and seeds) of common bean. The results presented for *PvTRE1* transcript accumulation analysis are from six independent ($n=6$) composite plants, and shown as mean \pm SD. b) Sucrose synthase (*PvSUS1*) transcript accumulation profile during nodule maturation, and nodule trehalose content profile during nodule maturation. The results presented for *PvSUS1* transcript accumulation analysis are from six independent ($n=6$) composite plants, and shown as mean \pm SD. The results presented for trehalose quantification are from three independent ($n=3$) experiments, and shown as mean \pm SD. c) *PvTRE1* and *GUS* transcript accumulation in K599 and pTdT-GUS-RNAi nodules. The results presented for *PvTRE1* and *GUS* transcript accumulation analysis are from six independent ($n=6$) composite plants, and shown as mean \pm SD.

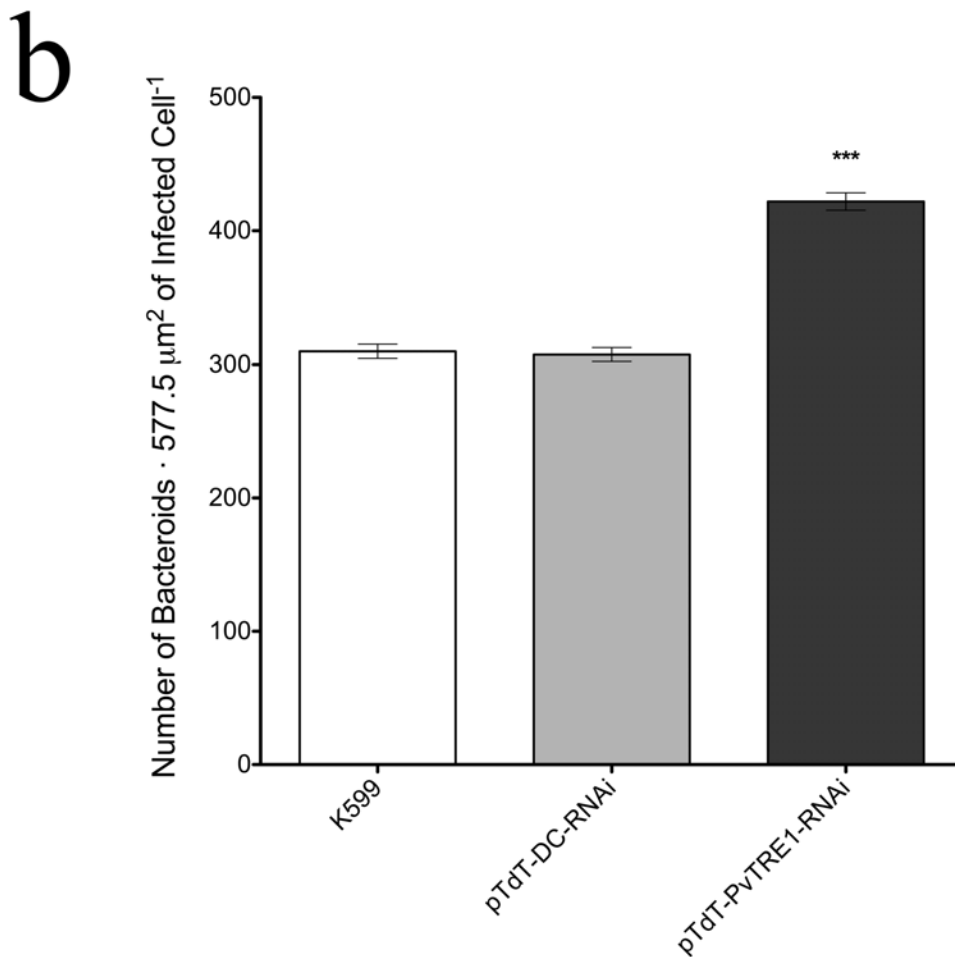
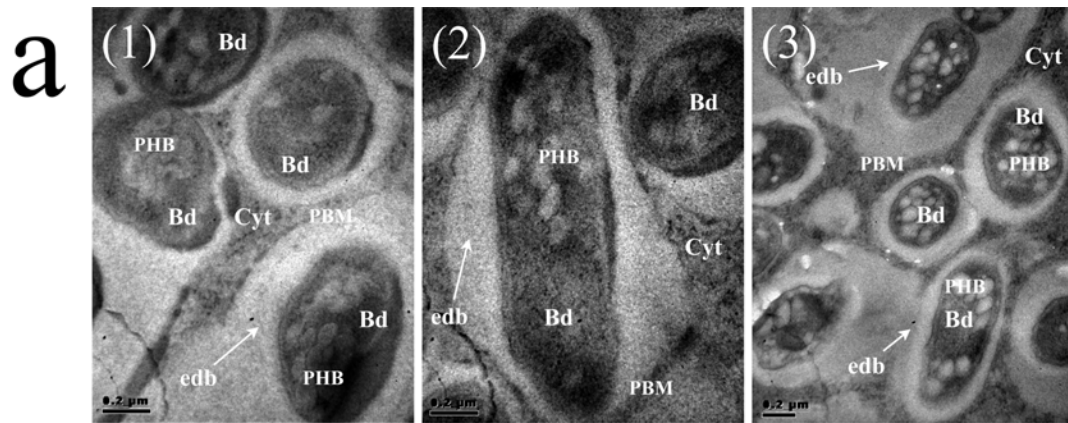


Fig. S3. Effect of *PvTRE1* silencing on bacteroids, and bacteroid counting per visual camp in TEM micrographs. a) TEM micrographs of bacteroids of transgenic nodules from different independent single transgenic root. Representative results are shown, and number in brackets indicates three of the six independent transgenic roots from composite common bean plants analyzed. b) Bacteroid number per visual camp in transgenic nodules. Representative bacteroid distributions at 3000x are shown ($n=3$), and statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's *t*-test (***) ($P < 0.001$). Means \pm SD are shown.

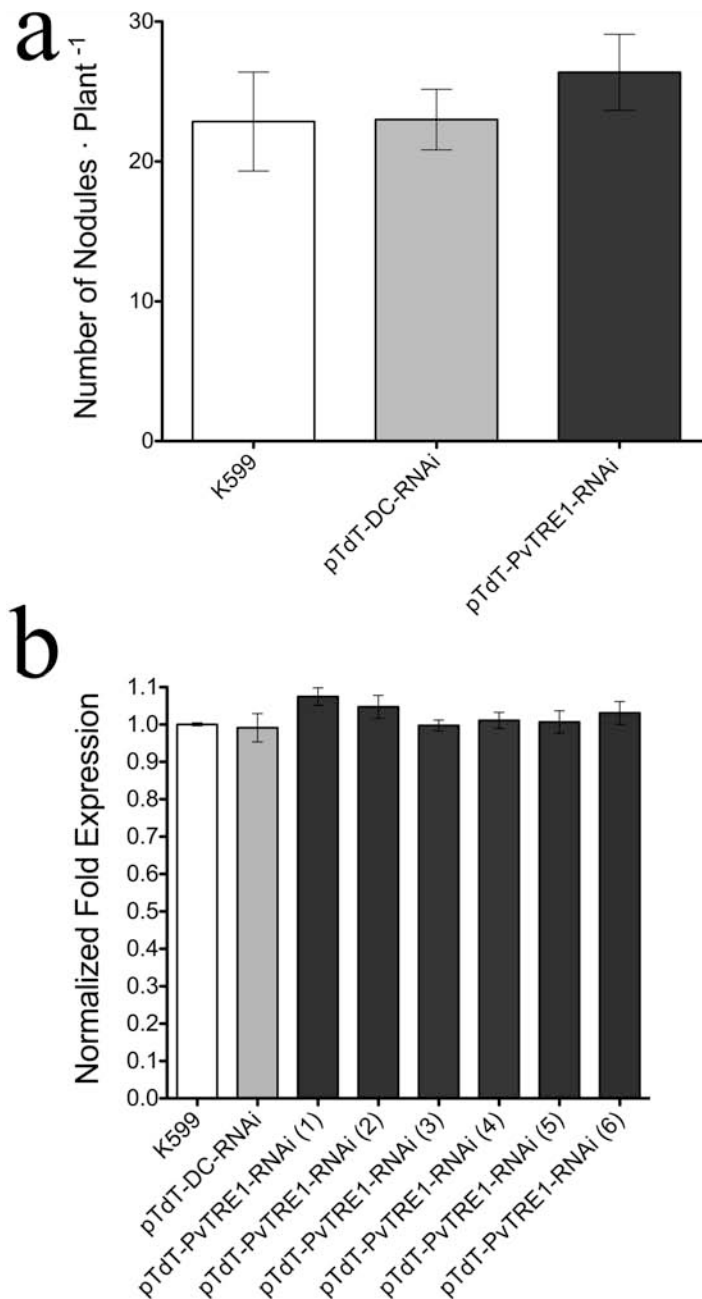


Fig. S4. Nodule number in *PvTRE1*-RNAi transgenic roots, and *GS* expression in *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules. a) Nodules produced in *PvTRE1*-RNAi transgenic roots. The results for nodule number are mean \pm SD from three independent ($n=3$) composite plants, and statistical analysis was performed with an unpaired two-tailed Student's *t*-test. b) *GS* expression in control or *PvTRE1*-RNAi transgenic nodules. The results for *GS* expression are from six independent ($n=6$) composite plants, and statistical analysis was performed with an unpaired two-tailed Student's *t*-test, and shown as mean \pm SD. The number in brackets indicates the independent transgenic roots from composite common bean plants analyzed.

Supporting Information

Table S1 List of oligonucleotides used for qRT-PCR

Primer Name	Primer Sequence	Target
qPvEF1aFor	GGTCATTGGTCATGTCGACTCTGG	PvEF1a
qPvEF1aRev	GCACCCAGGCATACTTGAATGACC	
qPvTRE1For	CGCCTCCAACAAACCGCCTTCGAG	PvTRE1
qPvTRE1Rev	ACGATCCCCTGGGCGTTGCGC	
qGUSFor	TAACCACGCGTCTGTTGACTG	β -Glucuronidase
qGUSRev	GGTTGCCAGAGGTGCGGATTCA	
qPvSUS1For	TGGTATCCAGATTTTCCATCCACAATG	Sucrose Synthase
qPvSUS1Rev	CCTTTGTGCAGCCTGCAGTTTATGAA	
qPvHXK1For	GATACCATTGGAAACATTAGCTGGAGGCAGATT	Hexokinase
qPvHXK1Rev	TTTTGGTATAAGGCCGTGCCATTTTGAATAGC	
qPvTORFor	GTGTTGCCAAAATTTCTGGAGGAATA	Target Of Rapamycin
qPvTORRev	TTACAGCCTTTTGTGGGCGAGAGTTGTTT	

qPvSnRK1For	GAGATTGGGAATGTTTTTCATCA	Sugar Non-fermentable Related Kinase1
qPvSnRK1Rev	GTTATCTCTGGGAAATTGTATGCTG	
qPvATG3For	TGCATCAAACACCCATTCACCAAGCAC	Autophagy gene 3
qPvATG3Rev	GCGGCGTGGATTGAGCACTATG	
qPvBeclinFor	TATCAGGAGGAGAGAGATGCGATCTTGG	Beclin
qPvBeclinRev	CCAAGTCGAAAGTTGTTAATTGTTCCAAACTCT	
qPvGOGATFor	ATGTCTTCATCAATCTCGTTTCCCACG	GOGAT (NADH_Glutamate Synthase II)
qPvGOGATRev	ACGCAACCGTGTTCACAAAACTTTGTC	
qPvGSFor	AGCACCAAGACAATGAGAAATGATG	GS (Glutamine Synthetase)
qPvGSRev	GTCGTCCTGTCAGACGGCG	