



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS**

## **“REORGANIZACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA EN LOS PELOS RADICALES DE FRIJOL DURANTE LA FORMACIÓN DEL HILO DE INFECCIÓN”**

### **T E S I S**

QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A:

Q.F.B. LUIS ALFREDO BAÑUELOS VAZQUEZ

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. LUIS CÁRDENAS TORRES (IBT-UNAM)

**INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:**

DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ (IBT-UNAM)

DR. ENRIQUE SALAS VIDAL (IBT-UNAM)

**CUERNAVACA, MORELOS**

**Marzo de 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Carmen Quinto del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Luis Cárdenas Torres. El proyecto fue parcialmente financiado por los donativos DGAPA-UNAM IN204409 y CONACYT 56631, 58323. Luis Alfredo Bañuelos Vazquez recibió una beca de maestría por parte del CONACyT (número de beca 303266).

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1 LOS PELOS RADICALES SON FUNDAMENTALES EN LA INFECCIÓN POR <i>Rhizobium</i> .....	3
1.2 EL CITOESQUELETO.....	9
1.3 MICROTUBULOS.....	9
1.4 FILAMENTOS INTERMEDIOS.....	10
1.5 MICROFILAMENTOS DE ACTINA.....	11
1.5.1 Origen y estructura.....	12
1.5.2 Dinámica de los microfilamentos.....	13
1.5.3 Toxinas que interfieren con la dinámica de la actina.....	15
1.5.4 Proteínas de unión a actina (ABPs).....	17
1.6 PROTEINAS FLUORESCENTES.....	18
1.6.1 mEGFP.....	18
1.6.2 mCherry.....	19
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>20</b>
2.1 REORGANIZACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN (Factores Nod) DE <i>Rhizobium</i> .....	20
2.2 pir y nap: MUTANTES AFECTADAS EN EL CITOESQUELETO DE ACTINA.....	21
2.3 PROTEINAS FLUORESCENTES QUE PERMITEN MARCAR EL CITOESQUELETO DE ACTINA.....	22
2.4 LIFEACT COMO NUEVA SONDA MOLECULAR.....	23
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>25</b>

<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>28</b>
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
6.1 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	29
6.2 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	29
6.3 TRANSFORMACION DE LAS CONSTRUCCIONES pK2GW7-LifeAct-mEGFP y pK2GW7-LifeAct-mCherry en <i>Agrobacterium rhizogenes</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
6.4 PROTOCOLO PARA LA INFILTRACIÓN DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
6.5 TRANSFORMACIÓN DE <i>Phaseolus vulgaris</i> CON <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	31
6.6 OLIGONUCLEOTIDOS PARA LA CONSTRUCCIÓN LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP.....	31
6.7 IMÁGENES POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	32
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
7.1 GENERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS pK2GW7-LifeAct-mEGFP y pK2GW7-LifeAct-mCherry.....	33
7.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA pK2GW7-LifeAct-mCherry Y pK2GW7-LifeAct-mEGFP EN HOJAS DE <i>Nicotiana benthamiana</i> AGROINFILTRADAS CON <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	34
7.3 GENERACIÓN DE RAÍCES TRANSGÉNICAS DE <i>P. vulgaris</i> .....	36

7.4 MICROFILAMENTOS DE ACTINA EN PELOS RADICALES DE <i>P. vulgaris</i> .....	38
7.5 FRAGMENTACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA MEDIANTE EL USO DE LATRUNCULINA B.....	41
7.6 SITIOS DE POLIMERIZACIÓN DE ACTINA EN PELOS RADICALES VIVOS DE <i>P. vulgaris</i> Y DURANTE LA FORMACIÓN DEL HILO DE INFECCIÓN.....	43
7.7 REORGANIZACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA EN LOS HILOS DE INFECCIÓN.....	45
<b>8. DISCUSION</b> .....	<b>49</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>50</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>51</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>52</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema de las fases de crecimiento de los pelos radicales de alfalfa.....	4
<b>Figura 2</b>	Esquema general del intercambio de señales en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosas.....	7
<b>Figura 3</b>	Estructura de la actina.....	13
<b>Figura 4</b>	Dinámica de polimerización de la actina.....	14
<b>Figura 5</b>	Toxinas que afectan la estabilidad de actina.....	17
<b>Figura 6</b>	Representación esquemática de la construcción quimérica LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP.....	33
<b>Figura 7</b>	Agroinfiltración en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> con la proteína quimérica LifeAct-mCherry.....	35
<b>Figura 8</b>	Agroinfiltración en hojas de <i>N. benthamiana</i> con la proteína quimérica LifeAct-mEGFP.....	36
<b>Figura 9</b>	Raíces transgénicas que expresan las construcciones LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP.....	37
<b>Figura 10</b>	Citoesqueleto de actina en un pelo radical de <i>P. vulgaris</i> .....	38
<b>Figura 11</b>	Fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia en la parte apical de los pelos radicales.....	39
<b>Figura 12</b>	Citoesqueleto de actina a lo largo del pelo radical de <i>P. vulgaris</i> con la construcción LifeAct-mEGFP.....	40

<b>Figura 13</b>	Fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia en la parte apical de los pelos radicales.....	40
<b>Figura 14</b>	Fragmentación de los filamentos de actina de LifeAct-mCherry mediante LatB.....	42
<b>Figura 15</b>	Fragmentación de los filamentos de actina de LifeAct-mEGFP mediante LatB.....	43
<b>Figura 16</b>	Pelos radicales tratados con citocalasina.....	44
<b>Figura 17</b>	Hilo de infección tratado con citocalasina.....	45
<b>Figura 18</b>	Reorganización de los microfilamentos de actina.....	47
<b>Figura 19</b>	Reorganización de los microfilamentos de actina a lo largo del hilo de infección.....	48
<b>Tabla 1</b>	Tabla de los nucleótidos utilizados para la construcción LifeAct-mEGFP y LifeAct-mCherry .....	32

## RESUMEN

Los pelos radicales son células de estructura tubular que crecen de manera apical, se derivan de células epidérmicas de la raíz y son muy abundantes. La función principal de estas células es la de incrementar la superficie de contacto de la raíz con el medio, y así incrementar la absorción de agua y nutrientes del suelo. También son capaces de detectar los cambios del medio así como, las señales extracelulares de los diferentes estímulos bióticos y abióticos. El citoesqueleto de actina juega un papel crucial durante el crecimiento polar tanto en células animales como vegetales. Este proceso ha sido ampliamente estudiado en las células de las microvellosidades intestinales y en las células neuronales de animales así como también en tubos polínicos y pelos radicales en plantas. Se sugiere que los filamentos de actina y la polimerización de estos en la región apical juega un papel crucial en mantener el crecimiento apical. Se ha establecido recientemente que la región apical es muy activa en la polimerización de actina y este proceso es esencial para el crecimiento polar. Con el fin de comparar la organización de los filamentos de actina y la dinámica de la misma se generaron raíces transgénicas en *Phaseolus vulgaris* que expresan una nueva sonda molecular llamada LifeAct-mEGFP o LifeAct-mCherry. Esta sonda molecular lleva un dominio de unión a actina capaz de marcar a los microfilamentos de actina y ha demostrado ser un excelente marcador para estudios *in vivo* tanto en células animales como en vegetales. Los resultados obtenidos demuestran una clara y dinámica organización de los microfilamentos en pelos radicales vivos en crecimiento y sugiere un papel del citoesqueleto de actina en la interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa.

## 1. INTRODUCCIÓN

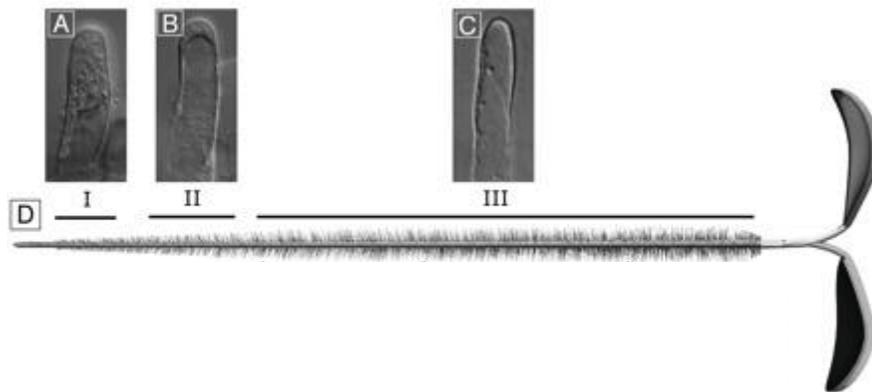
Entre las plantas leguminosas, la especie *Phaseolus vulgaris*, comúnmente conocida como frijol, es una de las leguminosas que más se consume por el ser humano, siendo ésta una fuente de proteínas de primer acceso en consumo para la población en general, principalmente en los países latinoamericanos (Coronado P.R.E. et al., 1995). Además de su importancia en la alimentación, a esta especie se le ha considerado como una planta modelo de estudio, lo que resulta en esfuerzos internacionales para su estudio que van desde la secuenciación de su genoma, hasta los análisis moleculares (van Rhijn and Vanderleyden, 1995) que tienen la finalidad de entender cómo es que estas plantas pueden establecer uno de los procesos más importantes sobre la Tierra, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. La simbiosis es un proceso que involucra la participación de bacterias del suelo la cual constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos distribuidos en diversos géneros: *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* los cuales forman asociaciones simbióticas con raíces de plantas leguminosas, como frijol, soya y alfalfa. Esta interacción, después de la fotosíntesis, es una de las más estudiadas y mantiene una especial importancia ya que estas bacterias poseen un complejo multienzimático conocido como nitrogenasa que convierte el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) en su forma reducida, el ion amonio ( $NH_4^+$ ), el cual es un compuesto asimilable por la planta. Gracias a este proceso, la planta utiliza el amonio sintetizado por los rizobios y se provee del nitrógeno que requiere para vivir. Los rizobios, a su vez, reciben esqueletos de carbono de la planta para sus funciones vitales. Este proceso de fijación biológica de nitrógeno que ocurre en la zona radicular hace prescindible el uso de abonos o fertilizantes nitrogenados para las plantas leguminosas, evitándose así los problemas de contaminación ambiental y las cuantiosas inversiones económicas que conlleva la fertilización química (Cárdenas, 2008).

## 1.1 LOS PELOS RADICALES SON FUNDAMENTALES EN LA INFECCIÓN POR *Rhizobium*

Los pelos radicales son células de estructura tubular que crecen de manera polarizada, se derivan de células epidérmicas de la raíz y son muy abundantes. En este tipo de crecimiento polar, las células se elongan a través de la secreción de vesículas en la región apical mediada por una activa participación del citoesqueleto. La función principal de los pelos radicales, es la de incrementar la superficie de contacto de la raíz con el medio y así incrementar la absorción de agua y nutrientes del suelo; también son capaces de detectar los cambios en la rizosfera así como, señales extracelulares de diferentes estímulos bióticos y abióticos (Zeiger, 2002).

Desde hace varios años, los pelos radicales han sido usados como modelo de estudio de diversos procesos celulares, son células que no se dividen y que presentan un crecimiento hacia afuera de la raíz. Además, son células que están aisladas y esto las hace particularmente útiles para la observación de procesos celulares *in vivo*. Otra particularidad importante, es que se puede tener una amplia representación de los diferentes estados de desarrollo en una misma célula al mismo tiempo, es decir, que se puede contar con células que están iniciando su crecimiento, que se encuentran en pleno crecimiento y células que se encuentran en su etapa madura o de envejecimiento (Figura 1). Esta propiedad permite estudiar los procesos asociados a cada uno de estos estadios, como son: la polarización de la membrana, el mantenimiento de los flujos iónicos, la exocitosis y la endocitosis dirigida, así como la dinámica del citoesqueleto (Meiri, 2005). Se ha encontrado que los pelos radicales de *Arabidopsis* presentan oscilaciones en el patrón de crecimiento y que estas oscilaciones están acopladas a cambios periódicos del gradiente intracelular de calcio, pH y ERO (especies reactivas de oxígeno) extracelular. Estas propiedades colocan a los pelos radicales como un excelente modelo de trabajo para poder entender el crecimiento oscilatorio presentado también por los tubos polínicos. Por otro lado, los pelos radicales

presentan otra cualidad que les permite utilizarse como modelo de estudio: ya que estas células no son esenciales para el desarrollo de las plantas. Por lo tanto se pueden generar mutantes incapaces de desarrollar pelos radicales y se pueden analizar bajo condiciones de laboratorio, permitiendo así la implementación de métodos de complementación. Por ejemplo, existen mutantes de *Arabidopsis thaliana* en una NADPH oxidasa que no generan pelos radicales (Foreman et al., 2003). Para el mantenimiento del crecimiento polar de los pelos radicales es necesaria una serie de factores, como el mantenimiento de un gradiente de calcio, pH, organización de todos los componentes del citoesqueleto, generación de un gradiente de EOR en la zona apical de pelos radicales de *Phaseolus vulgaris*, entre otros (Cárdenas et al., 2008; Mori and Schroeder, 2004).

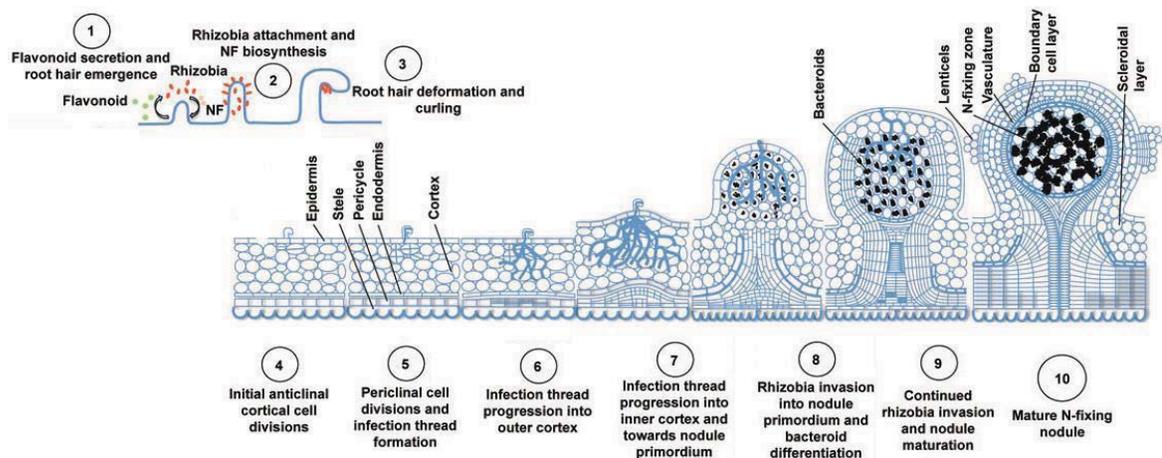


**Figura 1. Esquema de las fases de crecimiento de los pelos radicales de alfalfa.** Paneles A – C se muestra la morfología típica de los pelos radicales en las diferentes fases de crecimiento. En el panel A se ilustra un pelo radical iniciando su crecimiento con gran flujo citoplásmico, en el panel B un pelo radical en pleno crecimiento y el panel C un pelo radical maduro o en envejecimiento. En el panel D se esquematiza una planta de alfalfa en la cual se encuentran los pelos radicales a lo largo de la raíz principal en las diferentes etapas de crecimiento (Modificado de Gage, 2004).

Resulta interesante que todos estos factores necesarios para el crecimiento apical también se comparten con otras células con crecimiento polarizado como los tubos polínicos, hifas de hongos, algas filamentosas y conos neurales en células animales (Cárdenas et al., 2008). Por todas las características antes descritas, los pelos radicales han sido ampliamente utilizados para el estudio de diversos procesos celulares. El papel que juegan en la interacción con las bacterias del género *Rhizobium* es uno de ellos. Por ejemplo, la gran mayoría de los cambios inducidos por los FNs ( Factores de nodulación) ocurren en la región apical como es: la despolarización de la membrana, el aumento en el flujo de iones, exocitosis y endocitosis, así como la dinámica del citoesqueleto (Meiri, 2005). Esto sugiere, que existe una zona específica en la región apical, con propiedades únicas, que le permiten a estas células el crecimiento polar. Además regular el proceso de infección ya que son las responsables de formar un hilo de infección (estructura tubular que se forma con material de la pared del pelo radical, previniendo de esta manera el contacto directo entre el citoplasma de la célula vegetal y el rizobio) que le permite a la bacteria colonizar la raíz (Arrighi et al., 2008).

Para que la asociación simbiótica pueda tener lugar, se requiere de todo un mecanismo que involucra la secreción de moléculas señalizadoras por ambos simbios. Inicialmente la interacción simbiótica se establece cuando la planta secreta compuestos de naturaleza flavonoide en la zona de la rizosfera (Figura 2). Estos compuestos son reconocidos de manera específica por el *Rhizobium* a través de una proteína de membrana que se le ha denominado NodD, que tiene la capacidad de interactuar con el flavonoide de manera específica y en consecuencia activar la expresión de muchos genes presentes en la bacteria, a los cuales en su conjunto se les ha denominado genes *nod* (de nodulación) y que están involucrados en la síntesis y secreción de moléculas señalizadoras que son secretados a la rizosfera.

Estas moléculas señalizadoras se conocen como factores Nod (FNs) y no varían en su estructura básica pero si en los sustituyentes químicos dependiendo de la especie de *Rhizobium*. Es decir que estos pueden o no estar sulfatados o decorados con grupos acetilos, metilos, o contener un ácido graso determinado entre otros. Los FNs al ser reconocidos de manera específica por la planta hospedera inducen varias respuestas celulares que culminan con la formación del hilo de infección (Long, 1989). La formación de esta estructura es esencial para la entrada del *Rhizobium*. Simultáneamente las células del córtex entran en un proceso de división mitótica que da origen a la formación de un primordium y que posteriormente culmina con la formación de un nódulo en la raíz de la planta. El hilo de infección tiene la capacidad de crecer hasta el primordium en desarrollo guiando en su interior a las bacterias y posteriormente estas bacterias son liberadas de estas estructuras y endocitadas por las células que constituyen el primordium. Es importante considerar que para que la simbiosis pueda ser exitosa se debe tener la capacidad de superar al menos dos barreras de especificidad, la primera determinada por la capacidad de la bacteria al reconocer los flavonoides específicos secretado por la planta hospedera y la segunda, determinada por la capacidad de la planta para reconocer los FNs secretados por el *Rhizobium* (En Tao Wang et al., 2001).



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

Es por esto que el interés de nuestro grupo de trabajo es la interacción simbiótica, particularmente cómo la planta permite la internalización del simbiote a través del hilo de infección. Por lo tanto se sugiere que el citoesqueleto juega un papel fundamental para poder permitir reorganizar la maquinaria exocítica que mantiene el pelo radical en crecimiento. Sin embargo, a la fecha no existen reportes que demuestren en primer lugar como se reorganizan los microfilamentos a lo largo del hilo de infección en un pelo radical y como estos inician su reorganización durante las primeras etapas de la internalización de la bacteria. Es claro el papel que tienen los aumentos intracelulares de calcio en estas células durante las primeras etapas de la interacción (Cárdenas et al., 2008), pero también será de gran importancia entender como estos afectan la organización de los microfilamentos. Nuestro laboratorio ha sido pionero en la micro-inyección de sondas fluorescentes como faloidina (una droga con capacidad de unión a actina) fluorescente que

permitió estudiar la reorganización de los microfilamentos minutos después de agregar los Factores Nod producidas por el *Rhizobium* (Cárdenas et al., 1998). Sin embargo, estos enfoques no permitieron estudiar los microfilamentos en estados más tardíos debido a que esta sonda tiende a estabilizar los microfilamentos e inhibe en gran medida su dinámica. La visualización confiable del citoesqueleto de actina es esencial para diversos campos de la investigación biomédica. Los estudios realizados mediante la expresión de sondas moleculares fluorescentes (Actin Binding Proteins, ABPs-GFP por sus siglas en inglés) para visualizar los microfilamentos *in vivo* han tenido una gran aceptación (dos Remedios et al., 2003{Shibaoka, 1994 #21}). Sin embargo, con frecuencia los niveles de expresión altos pueden alterar la organización y dinámica del citoesqueleto como ya se describió anteriormente y por consiguiente el crecimiento, y por lo tanto dichos resultados deben ser cuidadosamente interpretados (Vidali et al., 2009).

Los estudios realizados en la actualidad con nuevos marcadores moleculares fusionados a GFP para el estudio del citoesqueleto de actina han demostrado no interferir en el crecimiento de las células animales y vegetales (Riedl et al., 2008; Vidali et al., 2009). Esto resulta de gran interés para los objetivos de nuestro laboratorio ya que estas nuevas sondas permitirán el análisis y la visualización de los rearrreglos de los microfilamentos de actina *in vivo* en respuesta a diversos factores externos. Existen varias sondas útiles para el estudio *in vivo* de los filamentos de actina (F-actina) que han sido desarrolladas y mejoradas. Una de estas sondas con resultados prometedores es LifeAct-mEGFP, en este sentido nosotros proponemos la utilización de esta sonda LifeAct para la visualización de los filamentos de actina (Era et al., 2009; Vidali et al., 2009) en los pelos radicales vivos durante su desarrollo y durante la respuesta a Factores Nod.

## **1.2 EL CITOESQUELETO**

El citoesqueleto está constituido por tres tipos de biopolímeros: microtúbulos (MTs), filamentos intermedios (FIs) y filamentos de actina o microfilamentos (MFs). Junto con estos biopolímeros hay todo un conjunto de proteínas implicadas en el control y regulación de su dinámica de polimerización/despolimerización.

El citoesqueleto en las células vegetales, al igual que en las animales, juega un papel importante en muchos aspectos del crecimiento incluyendo procesos fundamentales como la división celular, la expansión celular, la organización intracelular y la movilidad (Takemoto and Hardham, 2004). Durante la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos para sobrevivir, o reducir al mínimo el impacto negativo de una amplia gama de factores ambientales. El citoesqueleto de la planta por ejemplo es fundamental en la mediación de la respuesta de la planta, durante la movilidad de los cloroplastos bajo altas condiciones de luz, facilitar la detección de la gravedad, y la respuesta celular al daño directo (Takagi et al., 2009). Además de estos factores abióticos, las plantas también interactúan y tienen que tratar con una variedad de otros organismos que pueden ser socios potenciales o agentes patógenos (Takemoto and Hardham, 2004).

## **1.3 MICROTÚBULOS**

Estos constituyen un componente del citoesqueleto que tiene un papel organizador interno crucial en todas las células eucariotas, y a algunas también les permiten moverse. Los microtúbulos tienen numerosas funciones, como establecer la disposición espacial de determinados orgánulos, formar un sistema de rieles donde se pueden transportar vesículas o macromoléculas entre compartimentos celulares, son imprescindibles para la división celular puesto que forman el huso mitótico y son esenciales para la estructura y función de los cilios y de los flagelos (Luders and Stearns, 2007). En plantas, los microtúbulos son elementos clave de crecimiento de las células, la división y la morfogénesis. Además de su papel en el

desarrollo de la planta y la arquitectura, se han convertido en elementos reguladores de la señalización (Cyr, 1994). Durante la morfogénesis vegetal la matriz celular especial de microtúbulos dentro de la corteza celular (“matriz cortical”) es un arreglo que se encuentra adyacente a la membrana plasmática y que contiene muchos microtúbulos cortos que se superponen parcialmente en un patrón altamente organizado (Hardham and Gunning, 1978; Hardham and Gunning, 1979). El patrón de la matriz celular tiene cambios durante la diferenciación celular y el desarrollo (Shibaoka and Nagai, 1994). Por ejemplo en la rápida elongación de las células de la raíz del maíz, los microtúbulos están transversos a lo largo del eje de la raíz, y cuando las células detienen su elongación, los microtúbulos toman una organización helicoidal (Baskin et al., 1999). Quizás el papel central de los microtúbulos en las células vegetales que no se encuentra en las células animales es su relación con la deposición de componentes durante la síntesis de la pared celular. Por ejemplo, las microfibrillas de celulosa recién depositadas y los microtúbulos citoplasmáticos de las paredes celulares normalmente se coalinean, esto sugiere que los microtúbulos determinan la orientación de la deposición de las microfibrillas de celulosa (Bringmann et al., 2012), las cuales son un componente importante ya que contribuye a la fuerza de tensión de la pared celular. Además los microtúbulos pueden contribuir en buena medida a la direccionalidad de la expansión, pues la futura morfología de una célula depende de la orientación de las microfibrillas de celulosa (Bringmann et al., 2012; Somerville, 2006).

#### **1.4 FILAMENTOS INTERMEDIOS**

Un componente estructural importante de la cara interna de la envoltura nuclear en vertebrados e invertebrados es la lámina nuclear, existe una serie de 1-3 proteínas de la membrana extrínseca, laminas A, B y C. Estas proteínas son altamente homólogos a los filamentos intermedios y se clasifican como Tipo V. Las células vegetales contienen esta clase ancestral de los filamentos intermedios en su

núcleo y permite la regulación del ensamblaje y desmontaje de la envoltura, por lo que estos filamentos juegan un papel importante durante la mitosis en las plantas similar a la de las células animales (McNulty and Saunders, 1992). Además, los filamentos intermedios atraviesan el citoplasma formando una red la cual se extiende desde la envoltura nuclear hasta la membrana plasmática. Una red de filamentos intermedios se encuentra junto a unas membranas celulares confiriéndoles soporte mecánico. Por otra parte, en la membrana plasmática, los filamentos intermedios están adheridos por proteínas adaptadoras a uniones celulares especializadas llamadas desmosomas y hemidesmosomas, las cuales median respectivamente, la adhesión entre célula y célula, y entre la célula y la matriz (Harvey Lodish et al., 2000).

## **1.5 MICROFILAMENTOS DE ACTINA**

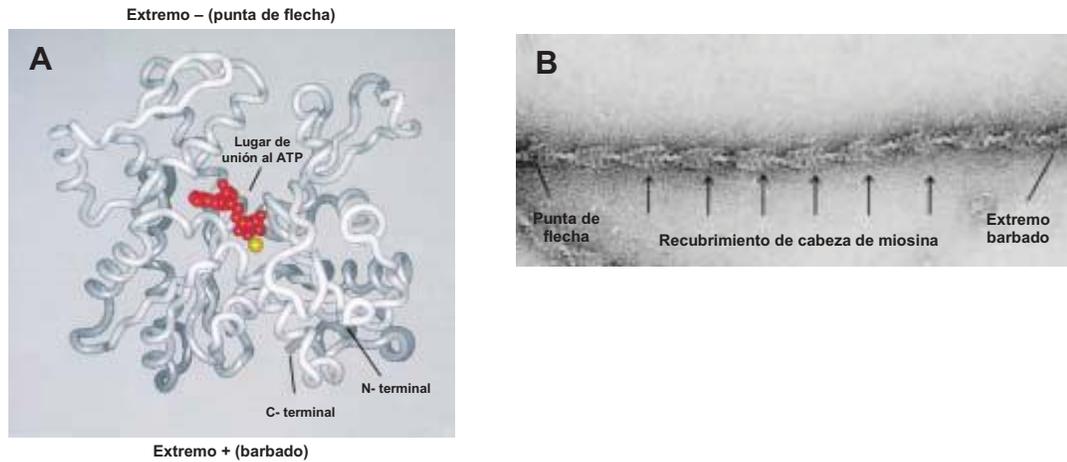
La actina es una familia de proteínas globulares las cuales pueden existir en dos formas principales, monómero de actina (G) y filamentos de actina polimérica o filamentosa (F). La actina está altamente conservada entre miembros de especies muy divergentes, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos (aa) de la actina de *Acantamoeba* (un género de *Amoebozoa*) es un 95% idéntica a la actina de vertebrados. Además muchas especies de actina disponen de múltiples isoformas de actina. Las cuales muestran diferencias estructurales y funcionales. Se sabe que el número de genes de actina por genoma varía desde 1 (en levadura) a unos 100 (en algunas plantas) (Cvrckova et al., 2004). Sus principales funciones fisiológicas son: la generación y mantenimiento de la morfología celular, el tráfico intracelular, la contractilidad, la motilidad, la división celular, la formación de microvellosidades, entre otras (Bretscher et al., 1994; dos Remedios et al., 2003; Drubin et al., 1993; Era et al., 2009; Higaki et al., 2007; Vidali and Hepler, 2001; Westphal et al., 1997). En las plantas, por ejemplo, es importante para la apertura y cierre de los estomas y durante el crecimiento de las células polarizadas como

los tubos polínicos, pelos radicales y tricomas de las hojas (Era et al., 2009; Vidali et al., 2009; Winder and Ayscough, 2005).

### 1.5.1 Origen y estructura

Los microfilamentos de actina (F-actina) tienen un grosor de 3 a 7 nm de diámetro y están compuestos de proteínas globulares (G-actina) y son regulados por proteínas relacionadas (Actin Related Proteins, ARPs por sus siglas en Inglés) o de unión (Actin Binding Proteins, ABPs por sus siglas en Inglés) a actina globular (G-actina) o filamentosa (F-actina). La red de MFs puede organizarse formando distintas estructuras como redes subcorticales o fibras de estrés que determinan y mantienen la morfología celular en células animales. Los MFs son un componente fundamental del citoesqueleto los cuales participan en el movimiento celular ya sea proporcionando una fuerza de locomoción durante la polimerización de actina y, por otro lado, contribuyen al transporte intracelular sirviendo como “carriles” por los que viajan moléculas y estructuras membranosas, conducidas a través de motores moleculares (miosinas) (Charras et al., 2005). La actina es la proteína más abundante en la célula eucariota constituyendo más del 15% de la proteína total. Se trata de una proteína globular de 375 aa con un peso molecular de 43 kDa. Los monómeros de actina unen los nucleótidos de ATP o ADP y/o los cationes  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  con afinidades del orden nM. Así existen cuatro estados básicos para la actina: ATP-G-actina, ADP-G-actina, ATP-F-actina y ADP-F-actina, predominando las formas ATP-G-actina o ADP-G-actina. Estudios realizados mediante microscopía electrónica, la G-actina presenta una estructura globular, mediante análisis cristalográfico por rayos X se observa que en realidad consiste en cuatro subdominios distribuidos en dos lóbulos separados por una profunda hendidura que permite una relativa flexibilidad entre estos. En esta hendidura es donde tiene lugar la unión de los nucleótidos de ATP o ADP y/o los cationes  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ , cuya unión regula la conformación de la molécula (Figura 3). Al igual que la G-actina, la F-actina presenta polaridad, en donde se distingue un extremo (+) y

un extremo (-). Esta nomenclatura se debe a observaciones en el microscopio electrónico de MFs decorados con fragmentos del dominio S1 de la cadena pesada de miosina II, que confieren a la F-actina un aspecto similar a puntas de flecha, correspondiendo a la punta al extremo (-) o *pointed end* y la base al extremo barbado (+) o *barbed end* (Figura 3) (Harvey Lodish et al., 2000).

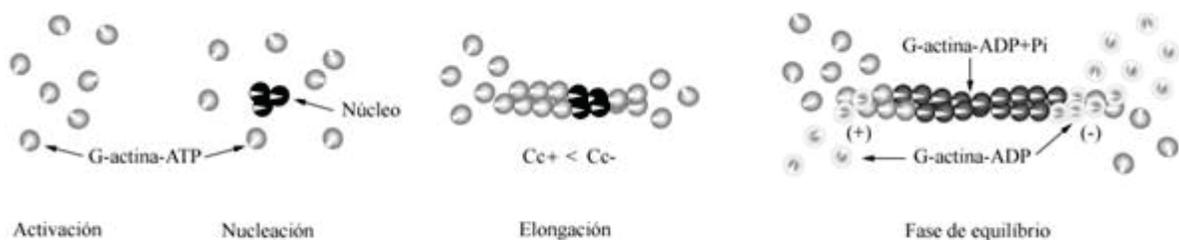


**Figura 3. Estructura de la actina.** A. diagrama de cinta del monómero de actina basado en la estructura cristalográfica del complejo actina. B. MFs decorados con el fragmento S1 de la cadena pesada de la miosina II (flechas) (Harvey Lodish et al., 2000).

### 1.5.2 Dinámica de los microfilamentos

La formación de MFs como consecuencia de la polimerización de G-actina puede tener lugar de forma espontánea *in vitro* en presencia de  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  o  $Na^+$  y se cree que este mismo proceso de polimerización se puede dar en células *in vivo*. Al inicio de la polimerización de actina, la unión de  $Mg^{2+}$  y ATP provocará la “**activación**” de la G-actina tras una serie de cambios conformacionales que le confieren susceptibilidad para polimerizarse (dos Remedios et al., 2003). Posteriormente tres monómeros de actina se unen entre sí para formar un oligomero o núcleo susceptible de polimerización, en un proceso llamado “**nucleación**”(Welch and Mullins, 2002). La siguiente fase de la polimerización es la “**elongación**” durante la cual la G-actina se une rápidamente a los extremos de

un núcleo de actina o filamento corto (cebadores), siendo la velocidad de polimerización distinta en los dos extremos del filamento. En el extremo (+), el crecimiento es más rápido que en el extremo (-). Esto es debido a que la concentración mínima de G-actina necesaria para que tenga lugar la polimerización o concentración crítica ( $C_c$ ) del extremo (+) es menor que la del extremo (-) (Dominguez, 2009). Eventualmente durante la elongación de un microfilamento tiene lugar la hidrólisis del ATP provocando una disminución en la afinidad de la G-actina para permanecer en el filamento lo que permite que los monómeros de G-actina-ADP+Pi sean susceptibles de disociarse o liberarse del polímero de F-actina en forma de G-actina-ADP. La elongación dura hasta que la adición de nuevas subunidades a los extremos de los MFs se iguala a la velocidad de disociación de las subunidades de estos. A esta concentración no se produce crecimiento neto del polímero, y se alcanza la fase de “**equilibrio**” o *treadmilling*. Ambos procesos (polimerización/despolimerización) se complementan de forma equilibrada para mantener a los MFs como una estructura “estable” pero altamente dinámica en la que los monómeros que componen el filamento son remplazados continuamente (Bugyi and Carlier, 2010) (Figura 4).



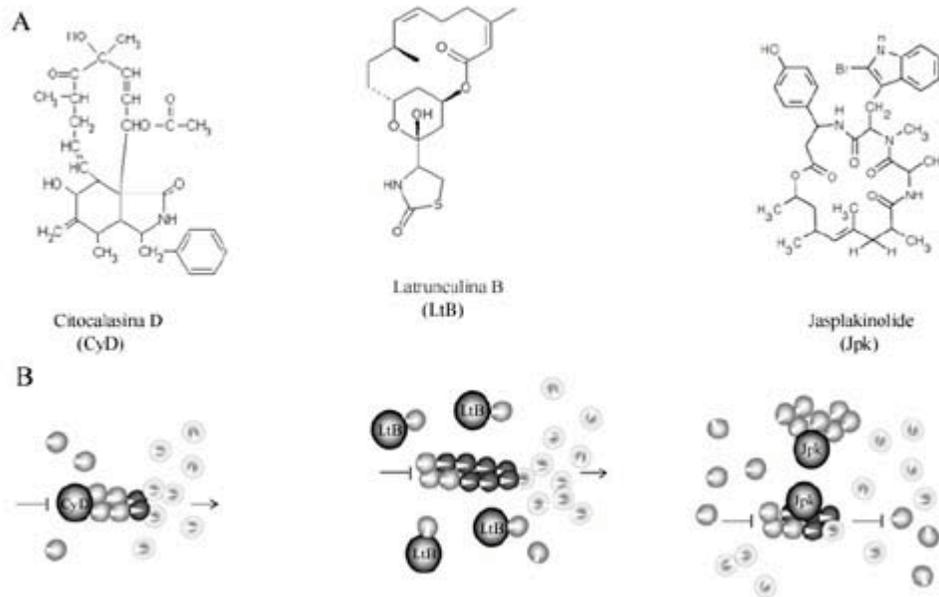
**Figura 4. Dinámica de polimerización de la actina.** Fases en las cuales los monómeros de actina se activan para dar lugar a la nucleación, evento crucial para la elongación de los filamentos de actina hasta llegar a una fase de equilibrio donde la misma cantidad que se polimeriza se está despolimerizando.

### 1.5.3 Toxinas que interfieren con la dinámica de la actina

La dinámica del citoesqueleto de actina puede modificarse mediante el uso de sustancias naturales que afectan alguna de las propiedades de los MFs y que se obtienen a partir de diversos animales como esponjas y nudibrancios marinos así como de plantas, hongos y bacterias. Su principal característica estructural es la presencia de un componente macrocíclico hidrófobo central englobado por grupos laterales estereoquímicamente complejos. En general, estas sustancias se dividen en dos grupos: (1) toxinas que bloquean/inhiben el ensamblaje o desestabilizan los MFs y (2) toxinas que promueven la polimerización o estabilizan los MFs. Los compuestos que bloquean o desestabilizan los MFs se unen a la G-actina en la hendidura donde tiene lugar la unión de los nucleótidos o bien en el extremo (+) de la F-actina (Allingham et al., 2006; Spector et al., 1999). Para provocar la despolimerización del citoesqueleto de actina se han utilizado clásicamente las citocalasinas (del griego *cytos-* célula; *chalsis-* relajación) que son metabolitos fúngicos cuya estructura química consiste en un anillo macrocíclico unido a un anillo de isoindol. Las citocalasinas actúan a nivel del extremo (+) de la F-actina donde se unen con una estequiometría 1:1 bloqueando la entrada y salida de G-actina lo que provoca la despolimerización de los MFs en los extremos (-). La citocalasina D obtenida del hongo *Zygosporium mansonii* presenta cierta capacidad para acelerar la nucleación de actina así como también se une al extremo (+) de la actina F impidiendo la adición de nuevos monómeros (Goddette and Frieden, 1985; Goddette and Frieden, 1986) siendo su eficiencia de despolimerización menor que la de otras toxinas desestabilizadoras de los MFs (Morris and Tannenbaum, 1980). Las latrunculinas son potentes inhibidores de la formación de F-actina y se obtienen en su mayoría a partir de esponjas de la familia Latrunculiidae (*Negombata* y *Latrunculia* sp.) (El Sayed et al., 2006; Spector et al., 1983). Se conocen distintas latrunculinas y en todas ellas destaca la presencia de un anillo macrocíclico unido a un anillo de tiazolidinona responsable de su actividad. La

estructura cristalina del complejo latrunculina A muestra como este compuesto se une con una estequiometría 1:1 entre los subdominios 2 y 4 del monómero de actina bajo el sitio de unión al ATP. Curiosamente en la latrunculina B aislada de *N. magnifica* la ausencia de 2 carbonos en el anillo macrocíclico provoca que la toxina presente menor citotoxicidad, probablemente por la pérdida de interacciones hidrofóbicas entre el anillo macrocíclico y la G-actina. Estas toxinas de actina secuestran los monómeros de G-actina (Spector et al., 1999) impidiendo su incorporación a la F-actina. Las latrunculinas unidas a la G-actina actúan como cuñas entre los subdominios 2 y 4 provocando una restricción en los cambios conformacionales de la G-actina requeridos para su polimerización e integración de la F-actina, esto provoca la despolimerización de los MFs al no tener disponibilidad de G-actina. Además, a concentraciones mayores de latrunculina ésta tiene el efecto de fragmentar el citoesqueleto de actina. Las toxinas que estabilizan la F-actina o promueven la polimerización de la G/F-actina generalmente presentan una estructura química de depsipéptido cíclico (son péptidos que contienen al menos un ciclo formado solamente por enlaces peptídicos o éster, derivados de ácidos hidroxicarboxílicos). El compuesto estabilizador más conocido es la faloidina (Pha) aislada del hongo *Amanita phalloides* (Cooper, 1987). Su estructura química consiste en un heptapéptido bicíclico que contiene aa poco frecuentes como la Cys<sup>3</sup>-Pro(OH)<sup>4</sup>-Ala-Trp<sup>6</sup>, el cual es esencial para su citotoxicidad (Oda et al., 2005). El compuesto Jaspilakinolide (Jpk) con capacidad de estabilizar F-actina e inducir polimerización de G-actina es producido por la esponja *Jaspis johnstoni*. El Jpk por su lado es un depsipéptido cíclico que compete con la Pha por el sitio de unión a la F-actina (Bubb et al., 1994; Bubb et al., 2000), la cual a su vez interacciona con 3 subunidades en la F-actina (Oda et al., 2005). Sin embargo, el Jpk difiere respecto a la Pha en cuanto a su estructura química y su capacidad para atravesar las membranas celulares. El Jpk contiene en su estructura macrocíclica ramificaciones laterales de grupos aromáticos en forma de aa infrecuentes como el N-metil-2(bromo)-L-triptófano que

resulta esencial para su unión a la F-actina (Figura 5) (Allingham et al., 2006; Spector et al., 1999).



**Figura 5. Toxinas que afectan la estabilidad de actina.** A. Estructura química de las toxinas despolimerizadoras CyD, LtB y de estabilizadora Jpk. B. Esquemas representativos del mecanismo de acción de las toxinas sobre los MFs (Allingham et al., 2006; Morton et al., 2000).

#### 1.5.4 Proteínas de unión a actina (ABPs)

Existe un gran número de proteínas que tienen la capacidad de asociarse a los microfilamentos y en su conjunto son llamadas proteínas de unión a actina (ABPs). Estas ejercen diversas acciones en los MFs, tales como el corte/ruptura (*severing*), bloqueo (*capping*) de los extremos del filamento, el entrecruzamiento (*cross-linking*), la adhesión con otras estructuras celulares, la generación de fuerzas de tensión intracelulares así como para el rápido crecimiento de los microfilamentos de actina ya que varias de las ABPs son las responsables de la iniciación y elongación de los filamentos (Wang et al., 2004; Winder and Ayscough, 2005).

Entre estas proteínas de unión a actina (ABPs) encontramos a la timosina  $\beta 4$ , la cual secuestra ATP-G-actina al unirse a la G-actina con una estequiometría 1:1 entre los subdominios 1, 2 y 3 (Safer et al., 1997) y bloquea la polimerización de la G-actina. La profilina también tiene un papel regulador en la polimerización de G-actina. Esta proteína se une con una estequiometría 1:1 a ATP-G-actina entre los subdominios 1 y 3, lo cual altera su conformación y evita su nucleación espontánea. Además tiene la capacidad de desplazar a la timosina  $\beta 4$  de su unión a la G-actina, de este modo mantiene siempre una reserva de G-actina susceptible de polimerizar (Pollard and Borisy, 2003).

Los miembros de la familia de la ADF/cofilina se unen a la ADP-G actina por el extremo (-) de la F-actina promoviendo su disociación. Estos se mantienen unidos a la ADF/cofilina y evitando así su reensamblaje o reincorporación. Además la ADF/cofilina también puede cortar a la F-actina ya que al unirse a la hélice del filamento puede distorsionar su estructura y generar tensiones que conduzcan a su ruptura, lo que genera múltiples fragmentos cortos de F-actina susceptibles de polimerizar. Se sabe que el dominio ADF comparte similitudes estructurales con la gelsolina (incluyendo el sitio de unión a actina) a pesar de la carencia de semejanzas en su secuencia (Van Troys et al., 1999). Sin embargo la gelsolina tiene una dependencia notable de las concentraciones intracelulares de  $Ca^{++}$ , mientras que ADF/cofilina depende de pH para su actividad (Southwick, 2000 {Kiselar, 2003 #311}).

## **1.6 PROTEINAS FLUORESCENTES**

### **1.6.1 mEGFP**

La proteína verde fluorescente GFP, es una proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. Esta proteína está compuesta de 238 aminoácidos (26.9kDa) que exhibe un emisión en el rango del azul (Tsien, 1998). Osamu Shimomura, en los inicios de la década de 1960, fue la primera persona en aislar la GFP a partir de

la *Aequorea victoria* e identificar qué parte era responsable de la fluorescencia. Entre los aspectos más importantes de la proteína verde fluorescente es que toda la estructura de 27 kDa es esencial para el desarrollo y mantenimiento de su fluorescencia. Asimismo es notable que el fluoróforo se deriva de un triplete de aminoácidos adyacentes: residuos de serina, tirosina y glicina en los lugares 65, 66 y 67 (Ser65, Tyr66 y Gly67) (Heim et al., 1995).

Debido a las necesidades de diversos colores y eficacia en su emisión, se han realizado diferentes mutaciones de la GFP, con el fin de mejorar la proteína. Por ejemplo una mutación en S65T ha mejorado las características de la GFP lo que resulta en un aumento de la fluorescencia, y su fotoestabilidad. Y una mutación en A206K genera la proteína monomérica mEGFP la cual resulta en un mayor brillo, coeficiente de extinción alto, y un rendimiento cuántico alto (McRae et al., 2005).

### **1.6.2 mCherry**

El desarrollo de la mCherry se inició con una secuencia de mutaciones que se introdujeron en mRFP por el laboratorio de Tsien (a través de la evolución dirigida). Entre sus características de la mCherry están una maduración rápida ( $t_{0.5} = 15$  min), es una estructura monomérica, su excitación máxima es de 587 nm y su emisión máxima de 610 nm y es muy fotoestable y resistente al fotoblanqueo (Shaner et al., 2004; Shaner et al., 2007).

## 2. ANTECEDENTES

### **2.1 REORGANIZACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA EN PRESENCIA DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN (Factores Nod) DE *Rhizobium***

Se han descrito diversos estudios que reportan la reorganización de los microfilamentos de actina en pelos radicales de leguminosas al ser tratados con factores de nodulación o el *Rhizobium* mismo. Para poder visualizar los microfilamentos de actina mediante microscopía se han utilizado drogas que permiten marcar la actina, tal es el caso de la faloidina fluoresceinada. Esta estrategia experimental ha permitido estudiar la distribución en forma de paquetes largos de actina organizados paralelamente desde la base del pelo radical y hasta la zona apical. Con esta metodología se ha demostrado que tras la exposición a los factores Nod de *R. etli*, por ejemplo, los microfilamentos de actina se fragmentan, y esto favorece la aparición de masas prominentes de fluorescencia difusa en la región apical de los pelos radicales (Cárdenas et al., 1998). Esta fluorescencia difusa es consecuencia de la fragmentación de la actina, ya que la faloidina fluoresceinada sólo fluoresce cuando se une a F-actina. Esta reorganización en el citoesqueleto de actina se da de manera rápida, ya que en un lapso de 5 a 10 min después de la aplicación de los factores Nod se observa la respuesta antes descrita. Es interesante ver que los microfilamentos de actina se recuperaron parcialmente aún con la presencia de los Factores Nod al cabo de una hora. Sin embargo, estas células todavía presentaban una cantidad significativa de fluorescencia difusa en la zona apical y en el área nuclear, presumiblemente indicando la presencia de filamentos cortos de actina. Por lo tanto estos resultados indican que los factores Nod alteran la organización de los microfilamentos de actina en los pelos radicales de frijol, y esto podría ser un indicativo de que se necesitan para la formación de los hilos de infección (Cárdenas et al., 1998).

## 2.2 pir y nap: MUTANTES AFECTADAS EN EL CITOESQUELETO DE ACTINA

Se han descrito algunas mutantes que interfieren con la formación del hilo de infección y la organización del citoesqueleto de actina. Entre las que se encuentran dos genes, Nap1 (por Nck-associated protein 1) y Pir1 (por 121F-specific p53 inducible RNA). Ambas proteínas forman parte del complejo SCAR/WAVE que activa al complejo ARP2/3, el cual es un componente del citoesqueleto de actina que puede unir filamentos de actina preexistentes y también nuclea nuevos filamentos de actina para generar nuevas ramificaciones de filamentos de actina (Kawska et al., 2012). Estas observaciones evidencian la importancia de estos genes en la organización del citoesqueleto. Además se ha descrito el papel de ambas proteínas en *Arabidopsis thaliana* y *Lotus japonicus* en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la formación del hilo de infección en *Lotus japonicus* (Li et al., 2004; Yokota et al., 2009). En ambos modelos las mutantes *nap1* y *pir1* desarrollan un exceso de primordios de nódulos no colonizados indicando que estos dos genes no son esenciales para la iniciación de la organogénesis del nódulo. Sin embargo, ambas mutantes se ven afectadas en la formación y progresión del hilo de infección hacia las células del córtex. En estos trabajos se demostró que estos defectos en la infección fueron por la perturbación de la organización del citoesqueleto de actina ya que pelos radicales cortos en estas mutantes muestran filamentos de actina en forma transversal mientras que los pelos radicales silvestres muestran una organización longitudinal de los microfilamentos de actina. Para corroborar estas diferencias en la organización de los microfilamentos de actina tanto las mutantes como las plantas silvestres se trataron con factores Nod. Resulta interesante que presencia de Factores Nod, las mutantes en *nap1* y *pir1* no mostraron afectado el citoesqueleto de actina mientras que en los pelos radicales silvestres se observa fragmentado el citoesqueleto de actina. Por lo tanto esto sugiere un papel importante del citoesqueleto de actina en el proceso simbiótico (Yokota et al., 2009).

## 2.3 PROTEÍNAS FLUORESCENTES QUE PERMITEN MARCAR EL CITOESQUELETO DE ACTINA

El uso de proteínas fluorescentes, en particular de la proteína verde fluorescente (GFP) para visualizar a la F-actina en las células vivas ha facilitado enormemente la comprensión de la dinámica de la actina. Inicialmente, las proteínas de fusión actina-GFP se utilizaron con éxito para visualizar los filamentos de actina en células animales, aunque los resultados no son los mismos en células vegetales ya que la actina-GFP (Westphal et al., 1997).

Esto probablemente debido a que la GFP afecta alguno de los sitios de unión de las proteínas que se unen a actina (ABP) y que regulan su función. Estos problemas fueron resueltos con el advenimiento de las proteínas de unión a actina como la fimbrina1 y talina, las cuales se fusionaron a la GFP y que si funcionan en células vegetales como sondas moleculares para la visualización de los microfilamentos (Kost et al., 1998; Sheahan et al., 2004). Estas dos sondas permitieron a los investigadores identificar los diferentes patrones de organización y la dinámica de los filamentos de actina en las plantas (Cheung and Wu, 2004; Era et al., 2009; Mathur et al., 2003). Sin embargo, uno de los grandes inconvenientes de estas sondas moleculares ha sido que la sobreexpresión de las ABP-GFP puede resultar en la formación de cables gruesos de actina, es decir que el entrecruzamiento de los filamentos de actina con las ABPs forman haces de actina más gruesos que normalmente no se verían en las células normales. Esta capacidad de cableado (bundling) ha limitado mucho el estudio de los microfilamentos ya que puede llegar a afectar el crecimiento de las células y los resultados tienen que ser cuidadosamente analizados y descritos (Era et al., 2009; Higaki et al., 2007).

## 2.4 LIFEACT COMO NUEVA SONDA MOLECULAR

Debido a las dificultades que presentan las sondas moleculares se estimuló el desarrollo de un nuevo marcador de F-actina con diferentes propiedades moleculares que no interfieran con la función de los microfilamentos de actina. Recientemente se ha demostrado que un péptido que comprende los primeros 17 aminoácidos de la proteína de unión a actina ABP140 de *Saccharomyces cerevisiae*, a la cual se le denominó "LifeAct". Dicha sonda tiene una capacidad importante de actuar como ligando a actina y de manera interesante no afecta la polimerización de la actina o despolimerización *in vitro* (Riedl et al., 2008; Vidali et al., 2009). Esta sonda se utilizó por primera vez de manera exitosa en células de mamíferos, LifeAct-GFP como se esperaba no afectó ninguno de los procesos dependientes de actina. Esto muy probablemente se debe a la baja o nula afinidad de unión de LifeAct por las proteínas de unión a actina (ABPs) endógenas y la ausencia de secuencias homologas a LifeAct en las proteínas endógenas de la célula de mamífero (Riedl et al., 2008) y posteriormente se utilizó para protonemas (órganos filamentosos y ramificados, que nacen de las esporas de los briofitos, y sobre el cual se desarrollan los gametofitos) en musgo vivo y tubos polínicos. Resulta importante mencionar que dado el tamaño pequeño de "LifeAct" permite fácilmente su incorporación a las GFP mediante simples técnicas de PCR además de que no afecta la dinámica de la actina, ni en el musgo *Physcomitrella patens* y tampoco en los tubos polínicos de *Lilium formosanum* y *Nicotiana tabacum* (Vidali et al., 2009). Se ha demostrado que LifeAct-mEGFP puede etiquetar los microfilamentos de actina, en el ápice de los protonemas del musgo y los tubos polínicos, una población de microfilamentos muy difícil de observar por otros métodos. Esto sin duda se debe a que la sonda molecular LifeAct no tiene ortólogos en células animales y vegetales así como competencia por los sitios de unión con proteínas endógenas de unión a actina (Riedl et al., 2008; Vidali et al., 2009). Por lo tanto para el modelo que nosotros proponemos LifeAct proporciona una excelente herramienta

para un análisis mucho más fino de los microfilamentos de actina en los pelos radicales de leguminosas durante la respuesta a los factores Nod, y de manera más importante durante la formación del hilo de infección (Cárdenas et al., 1998; Vidali et al., 2009).

En nuestro laboratorio tenemos antecedentes que demuestran que durante las primeras etapas de respuesta de los pelos radicales de *Phaseolus vulgaris* a los factores Nod existe una rápida fragmentación de los microfilamentos de actina con una eventual reorganización. Sin embargo, tenemos poca información sobre los eventos que suceden durante la formación del hilo de infección. Se ha sugerido que probablemente exista una acumulación de vesículas secretorias a lo largo del hilo de infección, pero ¿Cómo se organizan estas vesículas? y ¿Cómo se reorganizan los microfilamentos de actina durante la formación de hilo de infección? son preguntas de interés general que ameritan ser estudiadas para entender los mecanismos que regulan el proceso de crecimiento del hilo de infección durante el establecimiento de la simbiosis.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La utilización de bacterias como fertilizantes naturales en zonas áridas y semiáridas donde la agricultura es muy pobre o escasa, constituye una excelente alternativa para la agricultura sustentable. En particular el uso de plantas leguminosas como el frijol, soya, alfalfa y la asociación que establecen con bacterias benéficas del suelo capaces de fijar el nitrógeno atmosférico a una forma asimilable por las plantas, ha hecho de estos modelos de estudio una alternativa viable para prescindir de los fertilizantes nitrogenados generados por medio de la síntesis química que requiere de grandes recursos energéticos (Burity H.A., 1989; Sanaratne R., 1987; Sánchez-Yáñez, 1991). Esta asociación entre las plantas leguminosas y bacterias específicas del suelo del género *Rhizobium* se conoce como simbiosis y permite que ambos simbioses puedan desarrollarse y crecer de manera más eficiente.

Las leguminosas son capaces de formar interacciones con las bacterias del género *Rhizobium* gracias a la capacidad de contar con todo un mecanismo de percepción de señales liberadas por el microsimbionte. Específicamente las plantas cuentan en la zona radical con células de la epidermis que forman protuberancias y que se conocen como pelos radicales. Estas células permiten aumentar la superficie de absorción de agua y de nutrimentos. Además, estas células también permiten la formación del hilo de infección. El hilo de infección es una estructura tubular que se forma con material de la pared del pelo radical, previniendo de esta manera el contacto directo entre el citoplasma de la célula vegetal y el rizobio, y en consecuencia, la respuesta de defensa de la planta. Los pelos radicales como ya se mencionó son células cilíndricas que se forman de las células de la epidermis de la raíz, y una de sus características más importantes es aumentar la superficie de absorción. Este crecimiento altamente polarizado demanda una alta capacidad exocítica y endocítica, muy similar a lo observado en otras células con crecimiento polar como hifas de hongos, tubos polínicos, algas

filamentosas, y hasta el crecimiento de conos neurales en células animales (Cárdenas et al., 2008).

El citoesqueleto es una red de filamentos proteicos del citosol que ocupa el interior de todas las células animales tanto como vegetales. Esto adquiere una relevancia especial puesto que el citoesqueleto mantiene la estructura y forma de la célula. Además actúan como soporte para la organización de la célula y la fijación de orgánulos, así también es el responsable de muchos movimientos celulares (Higaki et al., 2007; Takemoto and Hardham, 2004). En particular el citoesqueleto de actina en plantas se sabe que participa en el crecimiento polar de las células como pelos radicales, tubos polínicos así también en la apertura y cierre de los estomas (Winder and Ayscough, 2005). Por lo tanto el estudio de los mecanismos involucrados en la organización, distribución y reorganización del citoesqueleto de actina en el crecimiento normal de los pelos radicales y durante el proceso de infección con *Rhizobium* resulta esencial para entender los mecanismos celulares que permiten el crecimiento polar y la interacción simbiótica.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los pelos radicales dependen de la organización del citoesqueleto para el mantenimiento del crecimiento apical, por lo tanto, estos elementos deben jugar un papel importante durante la formación del hilo de infección para permitir el cambio de polaridad y el crecimiento y avance del mismo.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la reorganización de los microfilamentos de actina durante la formación del hilo de infección en pelos radicales vivos de *Phaseolus vulgaris* inoculados con *Rhizobium*.

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Generar las construcciones 35S::LifeAct::GFP y 35S::LifeAct::mCherry y clonaras en un vehículo que permita transformar a *Agrobacterium rhizogenes* y su expresión en plantas.
- b) Generar plantas compuestas de *P. vulgaris* con las construcciones 35S::LifeAct::GFP y 35S::LifeAct::mCherry.
- c) Visualizar la organización de los microfilamentos de actina en los pelos radicales vivos de las plantas compuestas de *P. vulgaris* por microscopía de fluorescencia.
- d) Analizar la reorganización de los microfilamentos de actina en los pelos radicales de plantas compuestas de *P. vulgaris* que expresen las construcciones 35S::LifeAct::GFP y 35S::LifeAct::mCherry después de la inoculación con *Rhizobium tropici* (en particular durante la formación del hilo de infección) por microscopía de fluorescencia.
- e) Analizar los sitios de polimerización de actina en los pelos radicales vivos de plantas compuestas de *P. vulgaris* que expresen la construcción 35S::LifeAct::GFP durante la formación del hilo de infección por microscopía de fluorescencia utilizando como sonda fluorescente la citocalasina rodaminada.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Phaseolus vulgaris***

Las semillas de *P. vulgaris* var. Negro Jamapa se lavaron con agua corriente y se seleccionaron los frijoles más redondos, sin arrugas, que no tuvieran la testa rota, o muy descolorida, se colocaron en un matraz de 250ml y posteriormente se lavaron con H<sub>2</sub>O estéril (3 veces). También se lavaron con alcohol etílico industrial por un minuto, posteriormente se lavaron con hipoclorito de sodio 20% (cloralex) por 5 minutos y finalmente se lavaron con H<sub>2</sub>O estéril 3 veces para quitar el exceso de hipoclorito de sodio. Las semillas se germinaron en charolas metálicas previamente esterilizadas siguiendo el siguiente procedimiento: sobre una cama de papel absorbente humedecido con medio Fahreaus estéril a pH 7 y se cubrió con papel aluminio. Finalmente se incubaron a 28°C por 48 horas hasta su germinación.

### **6.2 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Nicotiana benthamiana***

Las semillas de *N. benthamiana* se trataron con una solución de cloro al 60% y Tritón X-100 al 0.08% durante 10 minutos. Después se lavaron cuatro veces con agua miliQ estéril durante 10 minutos y se guardaron a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, las semillas se colocaron en cajas de Petri con medio MS (Murashige & Skoog Salt Mixture, Invitrogen) sólido al 1% de Phytigel y se incubaron verticalmente de 5 a 10 días a 22 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Posteriormente, las plántulas se trasplantaron a macetas con Metromix como sustrato y se crecieron a 28°C en un cuarto especial de crecimiento (Luz/Oscuridad= 16h/8h) durante 6 semanas, las plantas se regaron cada 3 días con una solución B&D (Broughton and Dilworth, 1971). Después de

este tiempo, las hojas de tabaco son susceptibles de ser agroinfiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* cepa GB1301 (que porta las construcciones de interés).

### **6.3 TRANSFORMACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES pK2GW7-LifeAct-mEGFP Y pK2GW7-LifeAct-mCherry EN *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium tumefaciens***

La transformación en *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599 y *A. tumefaciens* cepa GB1301 con las construcciones hechas en el vector binario pK2GW7 se llevó a cabo por transformación de células quimiocompetentes. Las células se recuperaron en medio SOC durante 2 h a 30°C. Y posteriormente se plaquearon en medio LB con los antibióticos de selección (espectinomicina a 200 µg/ml para *A. rhizogenes* y espectinomicina a 200 µg/ml, tetraciclina 100 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml para *A. tumefaciens*) y se incubaron a 30 °C durante 48 h.

### **6.4 PROTOCOLO PARA LA INFILTRACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens***

Las bacterias se crecen previamente en 3 ml de medio LB líquido en presencia de los antibióticos apropiados (espectinomicina 200 µg/ml, rifampicina 100 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml), durante 48 h a 30°C en agitación constante. Se toman 100 µl de este cultivo y se transfieren a 6 ml de medio LB líquido sin antibiótico, suplementado con 10 mM buffer MES, pH 5.6 y 5 µl de acetosiringona 100 mM. El cultivo se crece durante 16 h a 28°C. Y cuando el cultivo ha alcanzado una  $DO_{600nm}$  de 1.0, se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min y el pellet se resuspende en 5 ml de 10 mM  $MgCl_2$ . Posteriormente se agregan 5 µl de acetosiringona a 100 mM y se deja incubando a temperatura ambiente durante 3 h. El volumen total de la suspensión de bacterias se toma con una jeringa (sin aguja) de 5 ml y mediante presión mecánica se inyectan en el envés de la hoja, procurando infiltrar en la

mayor área posible. Las plantas agroinfiltradas se incuban a 28°C durante 2 días para después observar las hojas al microscopio de fluorescencia.

### **6.5 TRANSFORMACIÓN DE *Phaseolus vulgaris* CON *Agrobacterium rhizogenes***

Las plántulas de *P. vulgaris* de 2 días de post germinación se inyectaron con *A. rhizogenes* K599 pK2GW7-LifeAct-mEGFP Y pK2GW7-LifeAct-mCHERRY en la parte inferior de los cotiledones (Estrada-Navarrete et al., 2007). La planta inyectada se colocó en un tubo de vidrio con medio B&D y se incubó a 28 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h sombra. La generación de las raíces transgénicas (“hairy roots”) ocurre aproximadamente a los 10 días post inyección. Las plantas que generaron raíces transgénicas se procesaron cortando la raíz principal que no se encuentra transformada y manteniendo a las raíces transformadas o transgénicas en medio Fahreaus a una temperatura de 28°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h obscuridad. Esto con la finalidad de promover el crecimiento de las raíces transformadas.

### **6.6 OLIGONUCLEOTIDOS PARA LA CONSTRUCCIÓN LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP**

Los oligonucleótidos mostrados en la siguiente tabla son los que se utilizaron para el desarrollo de las construcciones LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP.

**Tabla 1.** Tabla de los nucleótidos utilizados para la construcción LifeAct-mEGFP y LifeAct-mCherry respectivamente.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
LifeAct LUP (Long UP)	CACCATGGGTGTTCGCAGATTTGATCAAGAAATTCGA AAGCATCTCAAAGGAAGAAGTGAGCAAGGGGCGAG
LifeAct SUP (Short Up)	ATGGGTGTTCGCAGATTTGATCAAG
mCherry/mEGFP Up	CACCATGGTGAGCAAGGGGCGAGGAG
mCherry/mEGFP Lw	GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAG

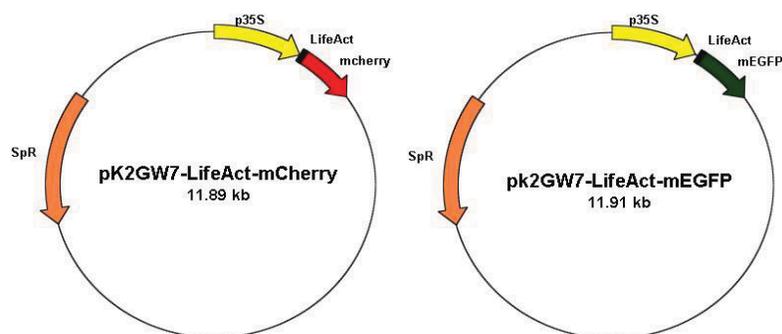
## **6.7 IMÁGENES POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Las raíces transgénicas que expresan las construcciones o dominios de unión a actina fusionadas a una proteína fluorescente (GFP y mCherry) se excitaron utilizando una fuente de fluorescencia (DG-4, Sutter Instruments) en la cual es posible seleccionar la longitud de onda con un filtro de excitación en la vía seleccionada. Esta unidad de fluorescencia está acoplada a un microscopio Nikon TE300, con óptica Nomarski y automatizado por medio del software Methamorph y Metafluor (Universal Imaging). Además, el sistema también cuenta con iluminación normal de luz transmitida que también puede ser utilizada en el momento necesario de manera automatizada ya que contiene un obturador (Uniblitz, Vincent Associates, USA) que se controla con el mismo software Methamorph. Las imágenes se colectan y procesan utilizando una cámara de CCD (Photometrics, Roper Scientific) que permite adquirir las imágenes de fluorescencia de baja intensidad. Los softwares Methamorph y Metafluor (Universal Imaging) permiten la manipulación de los aditamentos periféricos, la adquisición y el procesamiento de las imágenes. Las imágenes fueron finalmente editadas utilizando el software comercial Adobe Photoshop.

## 7. RESULTADOS

### **7.1 GENERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS *pK2GW7-LifeAct-mEGFP* y *pK2GW7-LifeAct-mCherry***

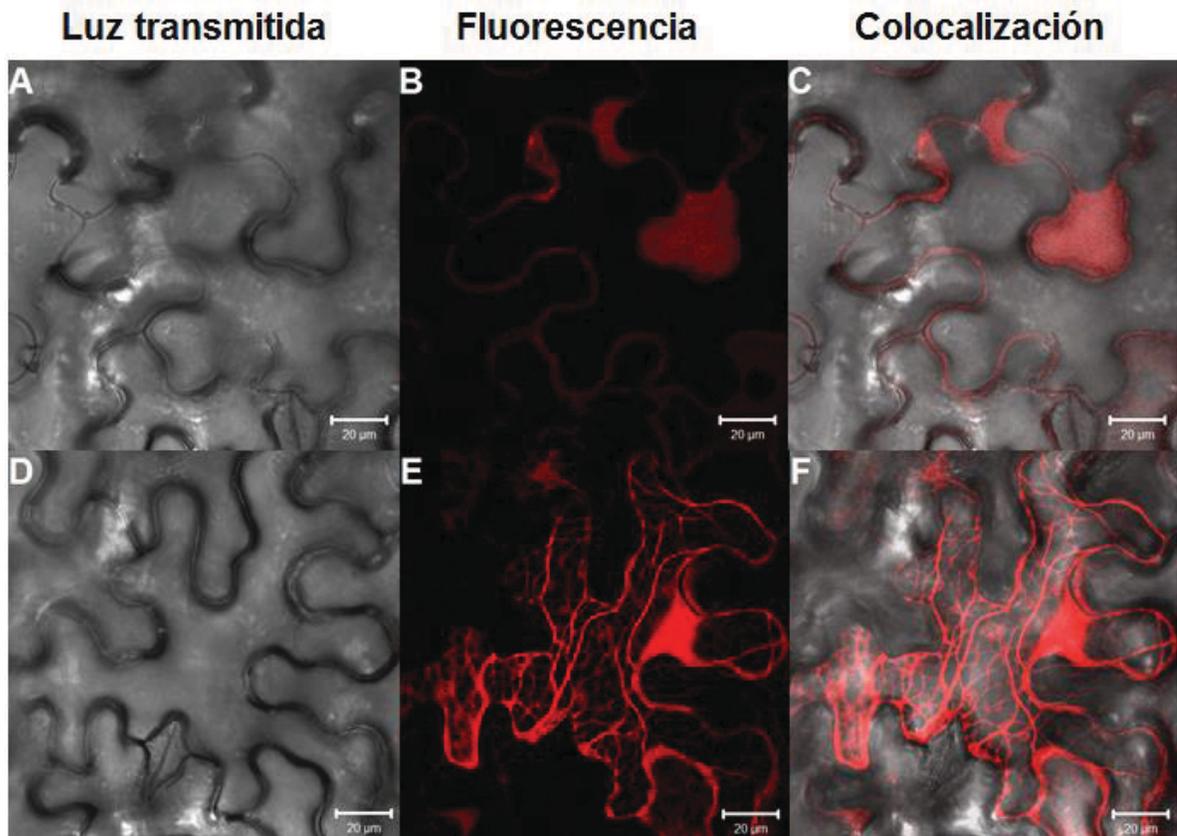
A partir de la secuencia LifeAct-mEGFP y LifeAct-mCherry, se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplificaron la región de interés de ambas proteínas. Posteriormente se clonó en el vector pENTR/TOPO (Invitrogen), este es un vector de entrada del Sistema Gateway, que se utiliza para movilizar de manera eficiente y rápida el gen de interés a un vector binario. La recombinación se realizó entre el vector pENTR/D-TOPO/ LifeAct-mEGFP y LifeAct-mCherry y el vector binario pK2GW7, y se transformó *E. coli*. Posteriormente se seleccionaron y se analizaron las colonias de bacterias mediante PCR y las que resultaron positivas se pusieron a crecer en el medio de selección adecuado. La recombinación se verificó por PCR para comprobar que las construcciones (*pK2GW7/ LifeAct-mEGFP* y *LifeAct-mCherry*) estaban correctas, además de que se secuenciaron para corroborar y asegurar que las construcciones de LifeAct-mEGFP y LifeAct-mCherry se encontraran insertadas en el plásmido destino (Figura6).



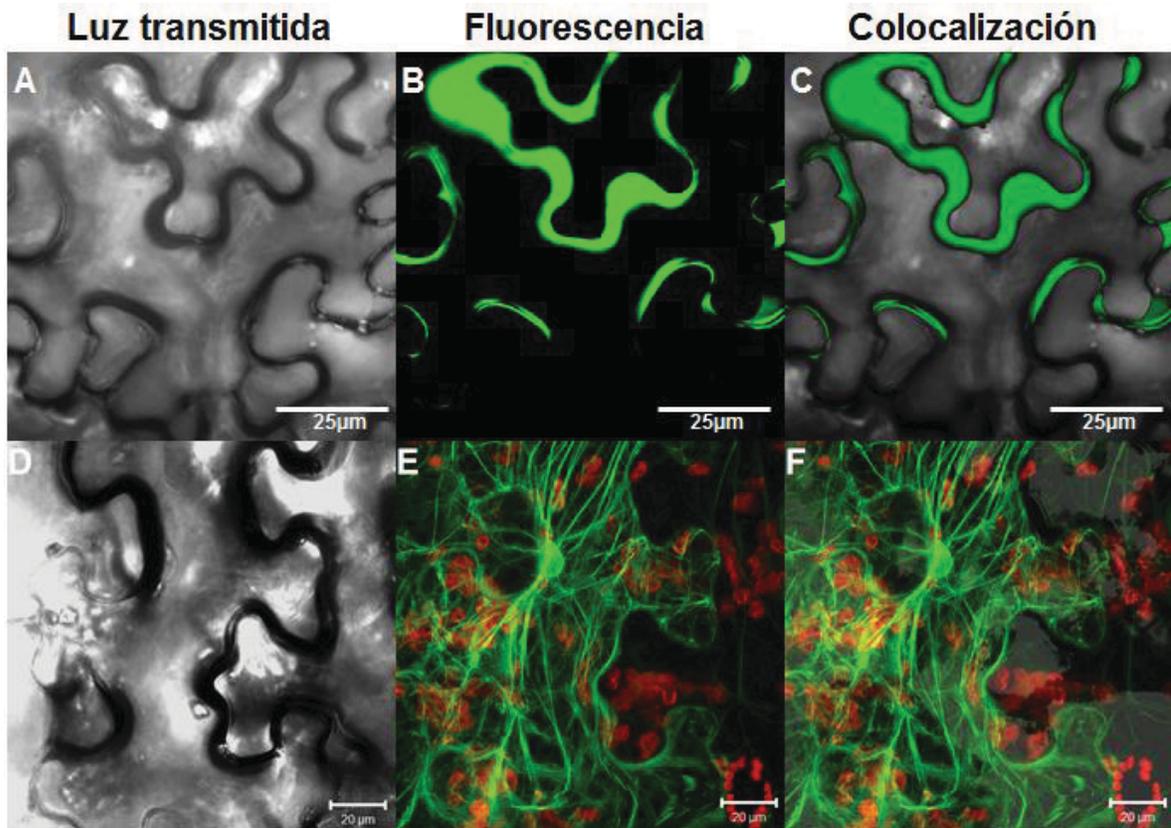
**Figura 6. Representación esquemática de la construcción quimérica LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP.** El cDNA de LifeAct y las proteínas fluorescentes GFP y mCherry fueron clonados en un vector de expresión para plantas bajo el promotor 35S.

## **7.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA pK2GW7-LIFEACT-mCherry Y pK2GW7-mEGFP EN HOJAS DE *Nicotiana benthamiana* AGROINFILTRADAS CON *Agrobacterium tumefaciens***

La agroinfiltración es una de las técnicas más utilizadas que nos permite saber de manera rápida la funcionalidad de las proteínas quiméricas que se requieren expresar en plantas. Nuestros resultados indican que pudimos expresar correctamente a nuestras proteínas quiméricas LifeAct-mEGFP y LifeAct-mCherry y esto nos permitió analizar la distribución del citoesqueleto de actina en las células del pavimento de las hojas de tabaco mediante microscopia confocal y epifluorescencia. Como se muestra en la figura 7 se observa de manera muy clara la distribución de los microfilamentos de actina en toda la célula con la construcción que expresa LifeAct-mCherry (Figura 7 D-F), así también se muestran las imágenes del control mCherry que no está fusionada al dominio de unión a actina donde se aprecia que la mayor parte de la fluorescencia es citosólica (Figura 7 A-C). De la misma forma, se analizó la construcción LifeAct-mEGFP, como se ilustra en la Figura 8 (páneos D-F): en las células del pavimento de tabaco agroinfiltradas, donde se puede apreciar una mayor cantidad de filamentos de actina en comparación con LifeAct-mCherry que se describe en la figura anterior. En color rojo se observan los cloroplastos donde se pueden ver que estos están ligados a los filamentos de actina (Figura 8, E, F). Conjuntamente, se muestran las imágenes del control con la mEGFP sin el dominio de unión a actina donde se aprecia que la fluorescencia es citosólica (Figura 8, A-C). Con estos resultados concluimos que nuestras proteínas quiméricas se expresan de manera efectiva en nuestro modelo de tabaco, lo que nos permite saber la dinámica y distribución en este tipo de células y por lo tanto expresarlas en nuestro modelo de interés de *P. vulgaris*, para observar tanto la organización, dinámica, y distribución de los microfilamentos de actina en las células de la raíz y particularmente en los pelos radicales *in vivo*.



**Figura 7. Agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana* con la proteína quimérica LifeAct-mCherry.** Paneles A – C. Expresión del control mCherry sin el dominio de unión a actina en células de *N. Benthamiana*, nótese que está solamente distribuido en el citoplasma. Paneles D – F. Expresión de la proteína quimérica LifeAct-mCherry (con el dominio de unión a actina) donde se observa la distribución en el citoplasma pero definiendo la arquitectura del citoesqueleto de actina en toda la célula.

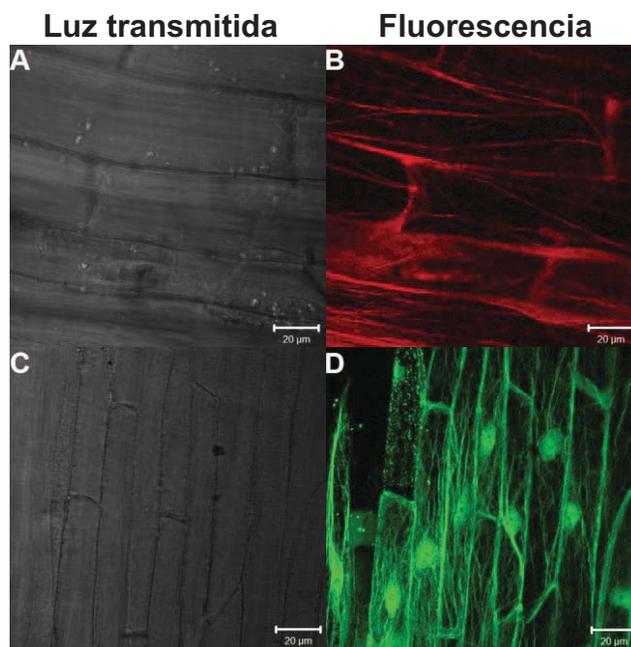


**Figura 8. Agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* con la proteína quimérica LifeAct-mEGFP.** Paneles A – C. Expresión del control mEGFP sin el dominio de unión a actina, nótese que está situado en el citoplasma de la célula. Paneles D - F. Expresión de la proteína quimérica LifeAct-mEGFP que contiene el dominio de unión a actina en la cual se puede observar la distribución del citoesqueleto de actina en toda la célula (panel E en color verde mostrando los microfilamentos de actina y en rojo se muestra la autofluorescencia de los cloroplastos).

### 7.3 GENERACIÓN DE RAÍCES TRANSGENICAS DE *P. vulgaris*

Considerando los resultados previos de nuestras proteínas quiméricas y con el fin de analizar la dinámica, distribución del citoesqueleto de actina en nuestro modelo de frijol, se generaron raíces transgénicas (ver materiales y métodos) de las construcciones que expresan LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP (Figura 9) para su análisis mediante microscopía confocal y de epifluorescencia.

Como se puede observar en la figura 9, existen diferencias notorias en las raíces que expresan nuestras proteínas quiméricas LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP. En primera instancia se observa una mayor sensibilidad y una distribución más homogénea de los microfilamentos de actina en las células epidermales por parte de la construcción LifeAct-mEGFP en comparación con las raíces que expresan LifeAct-mCherry. Es decir, que probablemente los niveles de expresión de LifeAct-mEGFP estén más elevados en comparación con LifeAct-mCherry, aunado a la mayor sensibilidad de la sonda lo cual nos permitiría marcar filamentos más delgados y como consecuencia se aprecia una mayor distribución en toda la célula. Estos resultados, nos permiten conocer la distribución de los microfilamentos de actina en las células de la raíz de frijol, y posteriormente ver cómo cambia o si permanece esta distribución durante la simbiosis



**Figura 9. Raíces transgénicas que expresan las construcciones LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP.** En los paneles A y B se muestra un segmento de raíz transgénica que expresa la proteína quimérica LifeAct-mCherry en la cual se observa la distribución de los microfilamentos de actina. En los paneles C y D se muestra un segmento de raíz transgénica que expresa la proteína quimérica LifeAct-mEGFP en la cual se observa la distribución de los microfilamentos de actina así también se puede observar los núcleos de la células de la epidermis.

#### 7.4 MICROFILAMENTOS DE ACTINA EN PELOS RADICALES DE *P. vulgaris*

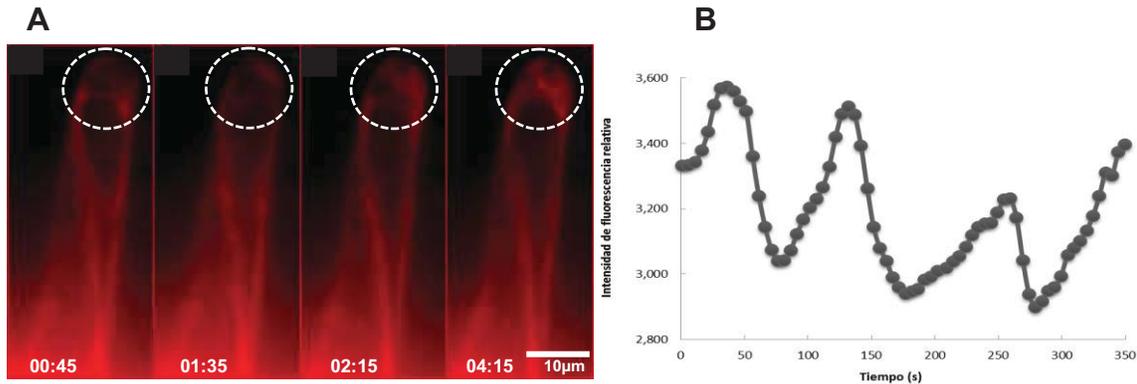
Con el propósito de estudiar específicamente la distribución y dinámica *in vivo* del citoesqueleto de actina en pelos radicales vivos de *P. vulgaris*, que como ya hemos hecho mención, son esenciales para el proceso simbiótico, se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia y confocal las raíces transgénicas que se habían generado de LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP. En la figura 10, se ilustra un pelo radical de frijol con la construcción LifeAct-mCherry donde se puede observar la distribución del citoesqueleto de actina en este tipo de células, en donde los filamentos de actina se encuentran orientados desde la base del pelo hasta la parte más apical del mismo.



**Figura 10. Citoesqueleto de actina en un pelo radical de *P. vulgaris*.** Distribución de los filamentos de actina a lo largo del pelo radical.

Asimismo, se analizó la dinámica de la intensidad de fluorescencia que presentan los pelos radicales *in vivo* en su parte apical (Figura 11 panel A). En la figura 11 panel B se grafica la intensidad de fluorescencia de la parte apical del pelo radical mostrado en el panel A en donde se aprecia de manera muy clara estas oscilaciones. Esto propone, que dichas oscilaciones son importantes para el crecimiento polarizado de los pelos radicales, debido a que en la parte apical pudieran estar ocurriendo eventos de polimerización y despolimerización de actina lo cual explicaría estas oscilaciones en la intensidad de fluorescencia. Además de que en la parte apical de los pelos radicales existen diversas acciones, entre las cuales se encuentran oscilaciones de calcio, de vesículas secretorias,

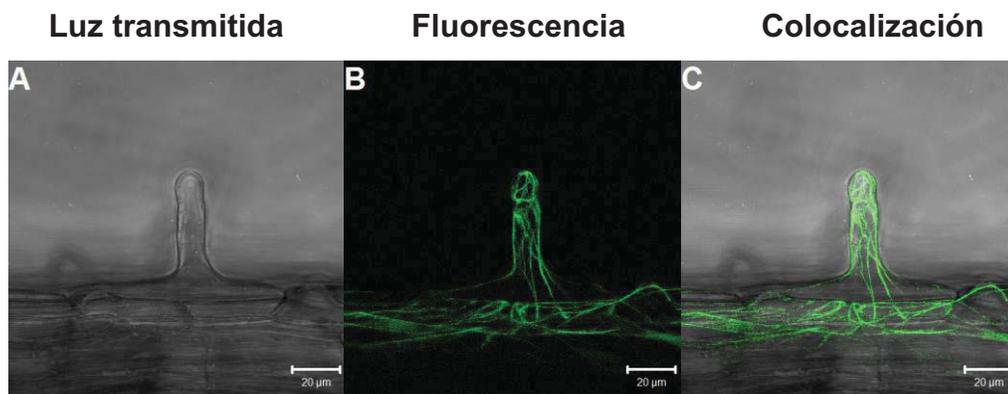
oscilaciones de ERO y en tubos polínicos se ha visto que existe una banda alcalina en la parte subapical que desaparece y aparece conforme el tubo polínico va creciendo y esto ve reflejado por oscilaciones de ADF (Actin Depolymerization Factor por sus siglas en ingles).



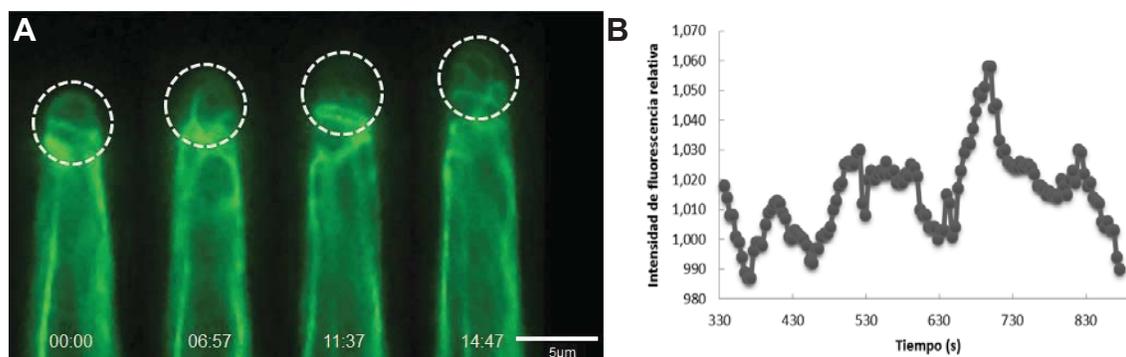
**Figura 11. Fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia en la parte apical de los pelos radicales.** En el panel A se muestran una serie de imágenes de un pelo radical que expresa la construcción LifeAct-mCherry donde se puede observar en la parte apical (Círculos). La intensidad de fluorescencia cambia a lo largo del tiempo. En el panel B se muestra una gráfica que ilustra las fluctuaciones de la intensidad de fluorescencia del pelo radical de la figura A de la parte apical.

Del mismo modo, se realizó el experimento antes descrito, pero ahora utilizando LifeAct-mEGFP. Como se puede observar, en la figura 12 la distribución del citoesqueleto de actina en un pelo radical vivo de frijol, así como también en las células epidermales. Como hemos venido haciendo mención, respecto a las diferencias notorias que existen entre las sondas LifeAct-mEGFP y LifeAct-mCherry, en el que la primera de ellas nos permitió marcar filamentos de actina muy finos y delgados en la parte subcortical del pelo radical respecto a LifeAct-mCherry en la que se ve una fluorescencia difusa en la parte apical y filamentos más gruesos. También se analizaron las oscilaciones en la intensidad de fluorescencia en la región apical (Figura 13 panel A y B) en donde se aprecian estas oscilaciones a lo largo del tiempo. Comparando estos resultados entre las dos sondas utilizadas, se puede ver que existe un patrón algo similar respecto a las oscilaciones en la intensidad de fluorescencia que existen; y las diferencias

que pudieran existir se podrían deber a la zona de crecimiento de los pelos radicales que fueron analizadas. Debido a que un pelo radical en constante crecimiento tiene oscilaciones más rápidas (Figura 12) respecto a un pelo radical en no crecimiento (Figura 11). Por lo tanto, estos datos sugieren, que estas oscilaciones son importantes durante el crecimiento apical de los pelos radicales.



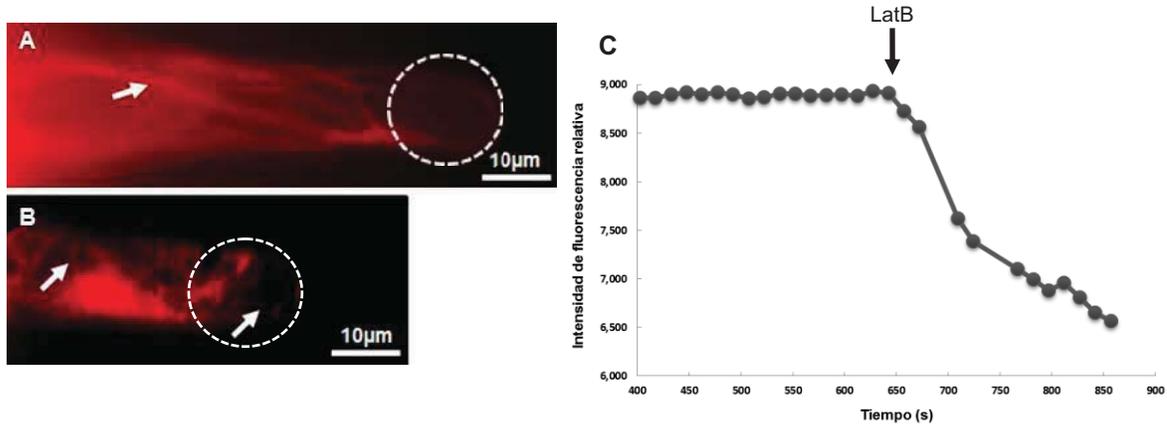
**Figura 12. Citoesqueleto de actina a lo largo del pelo radical de *P. vulgaris* con la construcción LifeAct-mEGFP.** Se puede observar la distribución del citoesqueleto de actina a lo largo del pelo radical, también se pueden observar filamentos cercanos al ápice del pelo radical y en las células epidermales.



**Figura 13. Fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia en la parte apical de los pelos radicales.** En el panel A se muestra una serie de imágenes de un pelo radical que expresa la construcción LifeAct-mEGFP como se puede observar en la parte apical (Círculos) la fluorescencia que va cambiando conforme el pelo radical va creciendo. En el panel B se muestra una gráfica de las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia del pelo radical de la figura A de la parte apical.

## **7.5 FRAGMENTACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA MEDIANTE EL USO DE LATRUNCULINA B**

El uso de drogas que pueden alterar el citoesqueleto de actina ha sido empleado por diversos grupos de trabajo, aquí nosotros presentamos el uso de la droga latrunculina B (LatB) que, como ya habíamos mencionado, tiene la capacidad de fragmentar el citoesqueleto de actina y por lo tanto ver como esta droga afecta el crecimiento apical de los pelos radicales. Se adicionó latrunculina B a una concentración de 50 nM a los pelos radicales vivos de frijol, que expresan la construcción LifeAct-mCherry con la que pudimos apreciar que existe una fragmentación de los filamentos de actina (Figura 14 A y B) observándose filamentos de actina cortos y una fluorescencia difusa a lo largo del pelo radical (Figura 14 B). Esto se puede ver de manera más clara en la gráfica (Figura 14 C), en la cual la intensidad de la fluorescencia en la parte apical del pelo se encuentra constante, sin embargo después del tratamiento con LatB disminuye. Como hemos mencionado en el experimento anterior, en el que la dinámica de los pelos radicales, específicamente en la región apical es constante (Figura 11 B y Figura 13 B), y después del tratamiento de la droga (LatB) el cual fragmenta el citoesqueleto de actina inhibiendo así su dinámica y por ende disminuye la intensidad de fluorescencia.

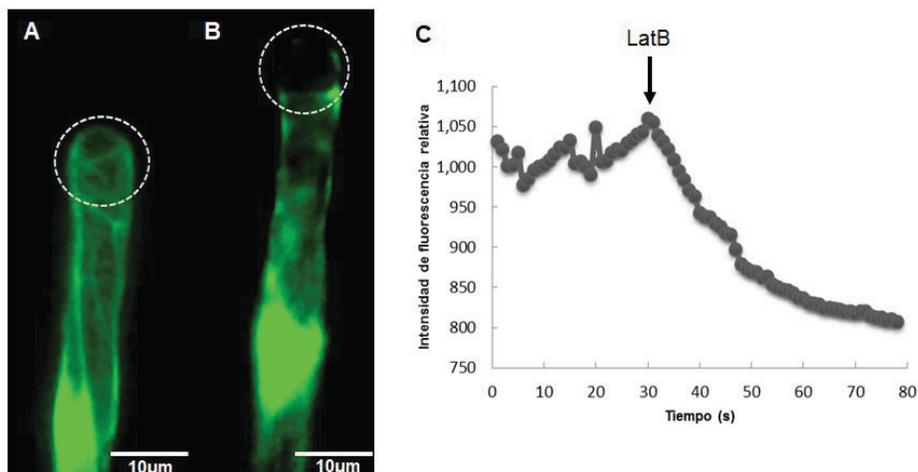


**Figura 14. Fragmentación de los filamentos de actina de LifeAct-mCherry mediante LatB.** En el panel A se puede apreciar la distribución de los filamentos de actina a lo largo del pelo radical sin tratar. En el panel B se muestra un pelo radical después de la aplicación de LatB en el que se puede apreciar de manera muy clara la fragmentación del citoesqueleto de actina. En el panel C se muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia del pelo radical (círculos) tras la aplicación de LatB, en la cual se puede ver una disminución de fluorescencia (las flechas indican los filamentos de actina en A y filamentos cortos de actina en B después del tratamiento con LatB).

Del mismo modo, se realizó el tratamiento de LatB (Figura 15 panel A y B) a los pelos radicales vivos de frijol que expresan la construcción LifeAct-mEGFP donde de igual manera se puede observar la fragmentación de los filamentos de actina después del tratamiento. También, se ve como disminuye la intensidad de fluorescencia con el tiempo al graficarla (Figura panel 15 C).

Estas mediciones en la intensidad de fluorescencia en conjunto con los datos anteriores se pudieron realizar utilizando el programa (Methamorph) el cual nos permite medir estos cambios en la intensidad de fluorescencia en la parte que deseamos analizar, en este caso lo hicimos en la parte apical de los pelos radicales. Por lo tanto, con los resultados de las figuras anteriores sobre la aplicación de LatB sobre los pelos radicales vivos de frijol que expresan las sondas LifeAct-mCherry y LifeAct-mEGFP, mostramos que el citoesqueleto de actina se ve fragmentado por el efecto de la droga, además de detener el crecimiento. Esto lo pudimos observar, mediante una toma de imágenes

consecutivas antes y después de la aplicación de LatB en la que se aprecia un constantemente crecimiento del pelo radical antes de la aplicación de la droga y posteriormente tras fragmentarse el citoesqueleto detiene su crecimiento (Datos no mostrados). Con estos datos, podemos concluir que el citoesqueleto de actina juega un papel crucial en el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

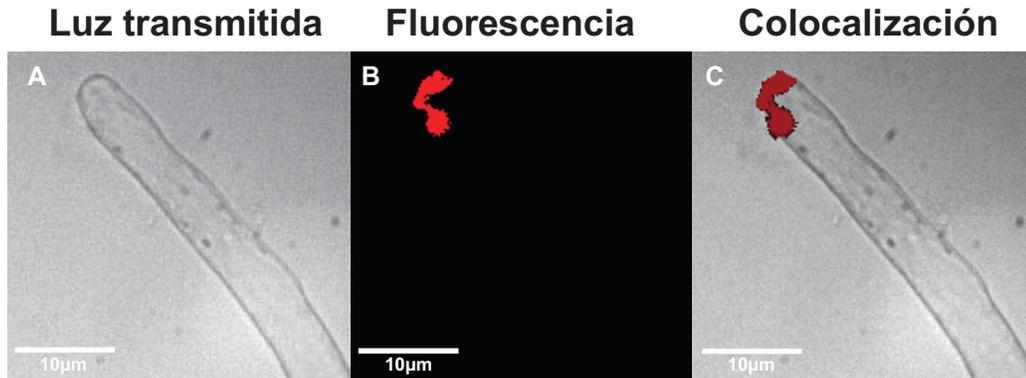


**Figura 15. Fragmentación de los filamentos de actina de LifeAct-mEGFP mediante LatB.** En el panel A se puede apreciar la distribución del citoesqueleto de actina a lo largo del pelo radical. En el panel B se induce la fragmentación del citoesqueleto de actina después de la aplicación de LatB. En el panel C se presenta la gráfica de la intensidad de fluorescencia de la parte apical (círculos) del pelo radical después de la aplicación de LatB.

## 7.6 SITIOS DE POLIMERIZACIÓN DE ACTINA EN PELOS RADICALES VIVOS DE *P. vulgaris* Y DURANTE LA FORMACION DEL HILO DE INFECCION

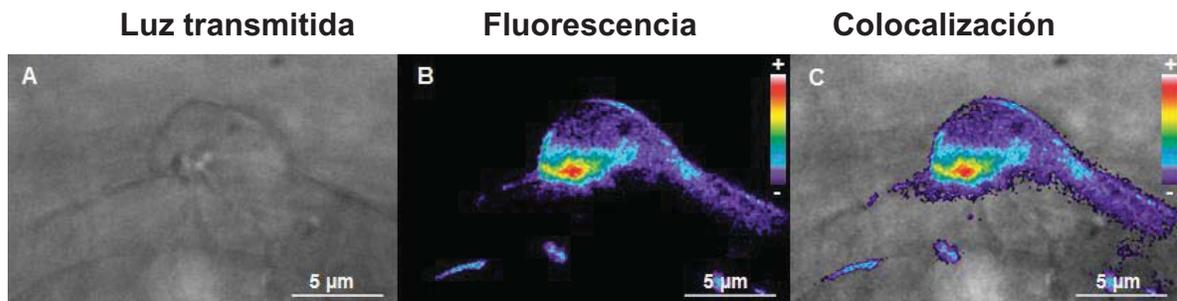
Con la finalidad ver los sitios de polimerización de actina, los pelos radicales vivos de frijol fueron tratados con la droga citocalasina rodaminada a una concentración de 5 – 10 nM. Esto se puede apreciar en la figura 16 (panel C, en rojo). En esta figura se aprecia claramente que los sitios activos de la polimerización de actina se encuentran en la parte apical del pelo radical, lo cual indica que en dicha parte es donde existe una mayor polimerización de los filamentos de actina y esto es esencial, para que el pelo radical pueda crecer, ya que los filamentos de actina

sirven como vías para el transporte de vesículas. Entre algunas de ellas, las cuales llevan en su interior la maquinaria necesaria para el crecimiento del pelo.



**Figura 16. Pelos radicales tratados con citocalasina.** En el panel A se muestra una imagen de un pelo radical por luz transmitida. En el panel B la fluorescencia de citocalasina rodaminada en la parte apical del pelo radical. C la localización de la fluorescencia de citocalasina rodaminada la cual se encuentra en la parte apical del pelo radical contra luz transmitida.

Por otra parte se realizó un experimento con la finalidad de ver la distribución de polimerización de actina en el inicio del proceso simbiótico en donde empieza a emerger el hilo de infección. Como se puede apreciar en la figura 17, donde la barra de pseudocolor indica las zonas de mayor actividad (rojo o blanco) y las de menor actividad (azul o morado), que precisamente en donde empieza a emerger el hilo de infección hay una mayor actividad de los sitios activos de polimerización de actina.



**Figura 17. Hilo de infección tratado con citocalasina.** A. Imagen de un hilo de infección por luz transmitida. B. Fluorescencia de citocalasina rodaminada la cual se encuentra en la parte donde se está formando el hilo de infección C. Colocalización de las imágenes de luz transmitida y fluorescencia de citocalasina rodaminada donde se aprecia la mayor actividad de los sitios de polimerización de actina.

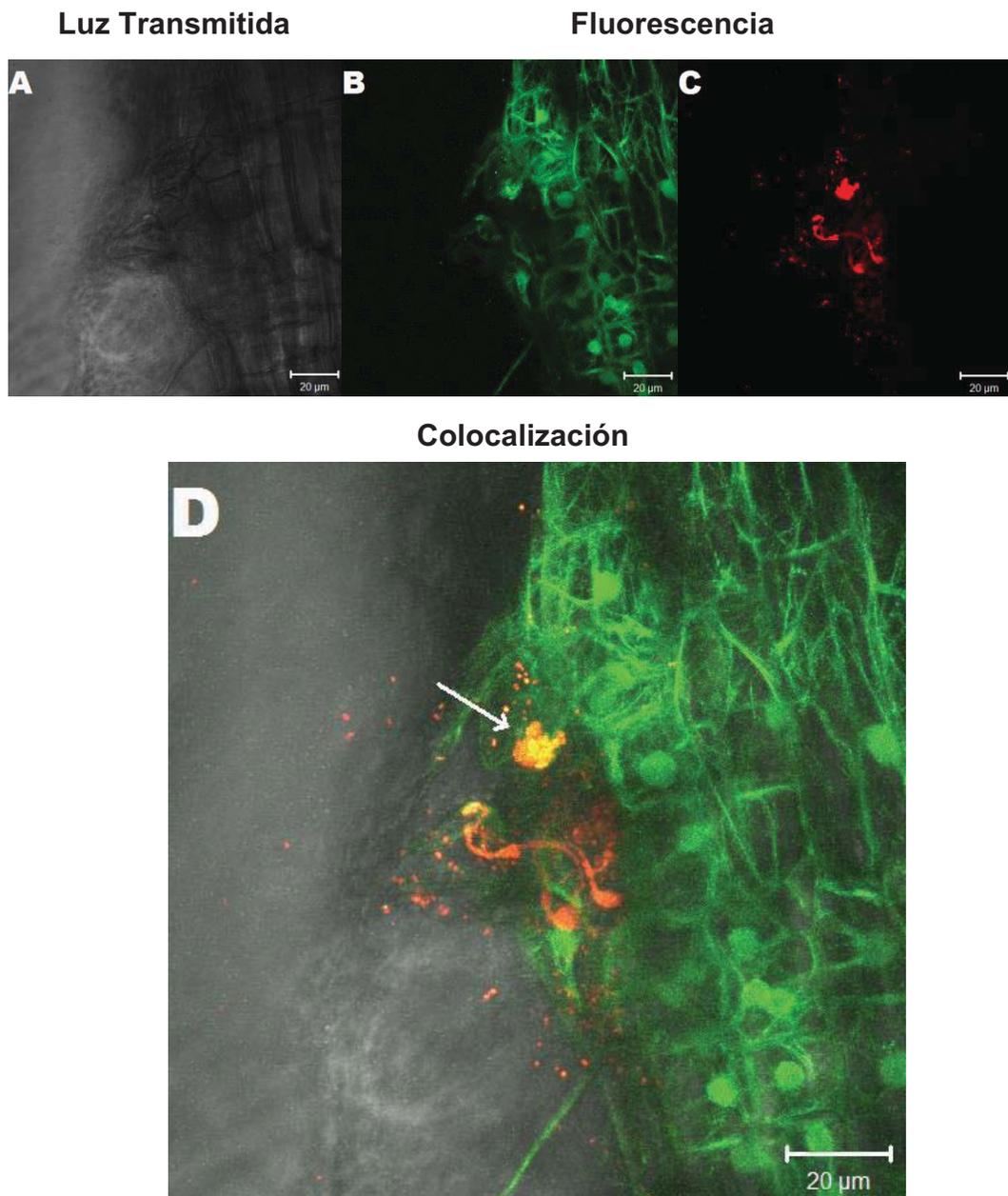
Este dato sugiere que precisamente existe una mayor actividad en el sitio donde empieza a emerger el hilo de infección. Como hemos hecho mención, el hilo de infección es una invaginación tanto de la membrana y pared celular del pelo radical, por lo tanto, no es de extrañarse que aquí sea donde el citoesqueleto de actina esté involucrado en permitir el avance del hilo de infección.

## 7.7 REORGANIZACIÓN DE LOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA EN LOS HILOS DE INFECCION

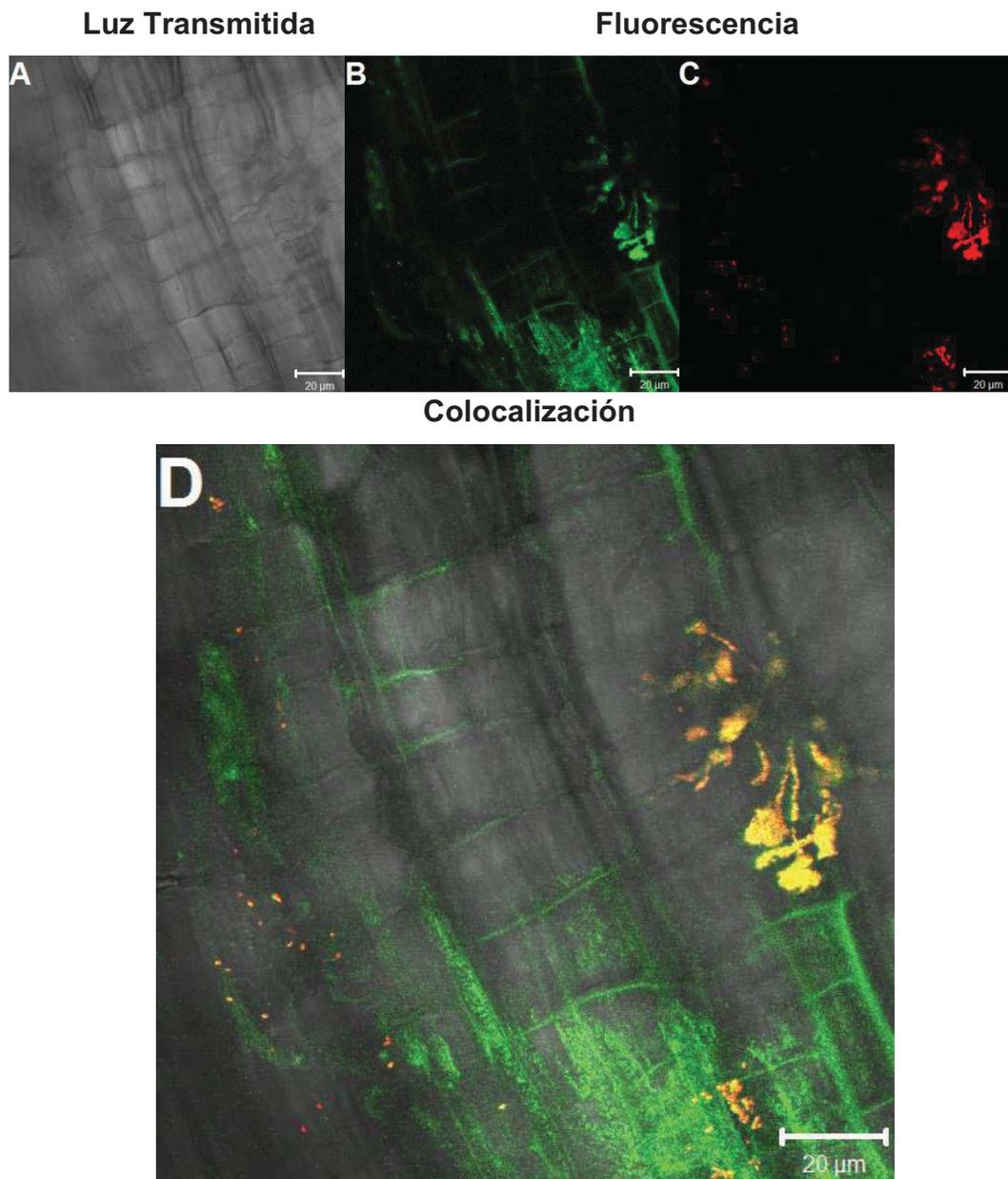
Debido a las deficiencias notorias que veníamos notando de la sonda LifeAct-mCherry, se tomó la decisión de no utilizarla para este experimento, por lo que decidimos solo utilizar la sonda LifeAct-mEGFP. La cual se inoculo con *Rhizobium tropici*-DsRed respectivamente y al cabo de 9 a 12 días post inoculación (dpi) se empezaron a formar primordios de nódulos en las raíces de las plantas transformadas. En este momento las zonas de infección fueron analizadas mediante microscopia confocal y de epifluorescencia con el fin de visualizar los eventos iniciales de la formación del hilo de infección. Como se puede observar en las figuras 18 y 19, se ilustra un hilo de infección en el que la planta esta

transformada con la construcción LifeAct-mEGFP y la bacteria se encuentra expresando la proteína roja fluorescente para poder visualizar a la bacteria y el citoesqueleto al mismo tiempo. Los resultados de este análisis muestran una colocalización de fluorescencia de LifeAct-mEGFP con la bacteria roja fluorescente. Esto no significa que LifeAct-mEGFP se encuentre en el hilo de infección si no que se encuentra rodeando al hilo de infección lo que sugiere que el citoesqueleto de actina se reorganiza alrededor del hilo de infección para la elongación del mismo. Otra observación interesante es en las células en división del córtex donde también se puede observar una reorganización del citoesqueleto de actina (Figura 18) comparándolo con la organización normal que se ve en la figura 9.

En esa misma figura se puede observar el inicio de la formación de un hilo de infección (flecha) en el que se ve una fluorescencia intensa de LifeAct-mEGFP precisamente en el sitio donde se está iniciando el hilo de infección lo que concuerda con los estudios previos de nuestro laboratorio del Dr. Luis Cárdenas, quien ha descrito que hay una fragmentación del citoesqueleto de actina en los pelos radicales. Esta fragmentación conlleva a una reorganización precisa del citoesqueleto para la formación y el avance del hilo de infección.



**Figura 18. Reorganización de los microfilamentos de actina.** En esta figura se muestra en el panel A la luz transmitida del pelo radical, en el panel B se muestra la fluorescencia en verde de la construcción que expresa LifeAct-mEGFP que marca el citoesqueleto de actina, en el panel C la bacteria (*R. tropici-DsRed*) en rojo y por último en el panel D se muestra la colocalización de las tres imágenes anteriores (la punta de flecha señala el inicio de la formación de un hilo de infección).



**Figura 19. Reorganización de los microfilamentos de actina a lo largo del hilo de infección.** En esta figura se muestra en el panel A la luz transmitida del hilo de infección ramificado, en el panel B se muestra la fluorescencia en verde de la construcción que expresa LifeAct-mEGFP que marca el citoesqueleto de actina, en panel C la bacteria (*R. tropici-DsRed*) en rojo y por último en el panel D la colocalización de las tres imágenes anteriores en donde se puede apreciar que colocaliza los filamentos de actina a lo largo del hilo de infección.

## 8. DISCUSION

LifeAct-mEGFP posee una ventaja significativa respecto a otras sondas moleculares usadas para marcar actina, esto debido a que no tiene ninguna homología con otras proteínas en plantas o animales evitando así la formación de masas o paquetes que pudieran interferir a la hora de marcar al citoesqueleto de actina. Además el tamaño de LifeAct comparado con otras ABPs es relativamente corto lo cual facilita su unión. Por lo tanto en este trabajo pudimos demostrar que LifeAct-mEGFP es una excelente sonda molecular para visualizar la dinámica y reorganización de los filamentos de actina *in vivo*. Sin embargo, en el transcurso de este proyecto como ya lo hemos mencionado en repetidas ocasiones se realizó la construcción por separado de LifeAct fusionado a mEGFP y mCherry. Dado los intereses de nuestro proyecto de tener ambas construcciones, con la finalidad de tener una mayor divergencia para poder utilizar otras drogas que estuvieran fusionadas a otras proteínas fluorescentes, y así evitar que estas sondas puedan interferir en sus longitudes de onda tanto de excitación como de emisión.

Por otra parte, LifeAct-mEGFP respecto a LifeAct-mCherry posee características que la hacen una mejor sonda molecular para marcar el citoesqueleto de actina y por lo tanto observar de una manera más fácil la dinámica y distribución de actina *in vivo*. Entre estas características se encuentran reportadas que mEGFP tiene un mayor brillo y rendimiento cuántico respecto a mCherry, por lo que fusionar LifeAct a mEGFP lo hace una mejor elección (Chudakov et al., 2010). Conjuntamente, nuestros datos resultaron fundamentales para entender el papel del citoesqueleto de actina en el proceso de invasión del *Rhizobium* a su célula hospedera *in vivo*. Además, no solo nos permite comprender de mejor manera como el citoesqueleto de actina participa en este proceso, sino también nos da una idea de lo que sucedería cuando una célula tanto animal o vegetal es invadida por un virus, bacteria, hongo, etc. Por lo tanto Lifeact-mEGFP es una herramienta útil para estudiar el papel de la actina en células vivas, lo que nos permitirá hacer un

análisis mucho más completo de los factores, tanto fisiológicos y moleculares, que están participando durante la simbiosis.

## **9. CONCLUSIONES**

En este trabajo utilizamos LifeAct (fusionado a mEGFP y mCherry) como una excelente sonda molecular para marcar filamentos de actina en células vivas de *P. vulgaris* y *N. benthamiana*. Nuestros resultados indican que LifeAct-mEGFP y mCherry no inhibieron el crecimiento apical ni en los pelos radicales ni en las células de tabaco, lo que nos permitió visualizar y analizar la dinámica de los filamentos de actina *in vivo*. Se pudo apreciar claramente que existe una mayor dinámica en la parte apical los pelos radicales, lo que al parecer es esencial para el crecimiento polar del mismo. Asimismo, en el proceso simbiótico nuestros resultados muestran que los filamentos de actina tienen una reorganización durante la infección. Esto debido a que los filamentos de actina se localizan de manera clara y precisa en el hilo de infección. Es decir rodeándolo, lo que sugiere que el citoesqueleto de actina podría estar confiriéndole cierta rigidez o estructura al hilo de infección para poder penetrar las células de la raíz. Por otra parte, las células de la raíz, en particular las células del córtex, tienen una reorganización muy particular durante la simbiosis.

Con estos resultados y apoyados por los estudios preliminares reportados por el Dr. Luis Cárdenas, en los que mostro una reorganización del citoesqueleto de actina, utilizando factores de nodulación. Esto hace que nuestro trabajo tenga una mayor relevancia ya pudimos mostrar la importancia del citoesqueleto de actina en el crecimiento polar de los pelos radicales *in vivo*, su dinámica, distribución y la importancia de este en la reorganización que existe durante la simbiosis desempeñando así un papel crucial para permitir el avance del hilo de infección hacia las células del córtex y como consecuencia la formación del nódulo.

## 10. PERSPECTIVAS

- 1. Ver la reorganización del citoesqueleto de actina en pelos radicales vivos de *Medicago sativa*.** Debido a que los hilos de infección en *Phaseolus vulgaris* son más pequeños, se dificulta un poco entender cómo se reorganiza el citoesqueleto de actina en los pelos radicales, y como se ha visto en el modelo de alfalfa estos hilos de infección son mucho más grandes, por lo tanto nos ayudaría entender de una mejor manera y a mayor detalle la reorganización de los filamentos de actina en los hilos de infección.
- 2. Ver si el cambio de pH puede alterar o afectar el citoesqueleto de actina.** Se sabe que algunas proteínas como el ADF tienen un papel esencial en el citoesqueleto de actina y están relacionados con los cambios de pH, de tal manera que modificando el pH podríamos darnos cuenta como el citoesqueleto cambia a estos estímulos.
- 3. Ver la distribución del citoesqueleto de actina en otros organelos como los cloroplastos.** Con la finalidad de entender mejor la distribución del citoesqueleto de actina en cloroplastos y el papel que pudieran estar teniendo con otros organelos *in vivo* hace interesante su estudio. Así como también el uso de drogas que nos permitan dar mayor información.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Allingham, J.S., V.A. Klenchin, and I. Rayment. 2006. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* 63:2119-2134.
2. Arrighi, J.F., O. Godfroy, F. de Billy, O. Saurat, A. Jauneau, and C. Gough. 2008. The RPG gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105:9817-9822.
3. Baskin, T.I., H.T. Meekes, B.M. Liang, and R.E. Sharp. 1999. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. II. Role Of cortical microtubules and cellulose microfibrils. *Plant Physiol.* 119:681-692.
4. Bretscher, A., B. Drees, E. Harsay, D. Schott, and T. Wang. 1994. What are the basic functions of microfilaments? Insights from studies in budding yeast. *J Cell Biol.* 126:821-825.
5. Bringmann, M., B. Landrein, C. Schudoma, O. Hamant, M.T. Hauser, and S. Persson. 2012. Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule-cellulose synthase nexus unraveled. *Trends Plant Sci.*
6. Broughton, W.J., and M.J. Dilworth. 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J.* 125:1075-1080.
7. Bubb, M.R., A.M. Senderowicz, E.A. Sausville, K.L. Duncan, and E.D. Korn. 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem.* 269:14869-14871.
8. Bubb, M.R., I. Spector, B.B. Beyer, and K.M. Fosen. 2000. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem.* 275:5163-5170.
9. Bugyi, B., and M.F. Carrier. 2010. Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annu Rev Biophys.* 39:449-470.

10. Burity H.A., M.A.F.B.E.C. 1989. Estimation of nitrogen fixation and transfer from alfalfa to associated grasses in mixed swards under field conditions. *Plant and Soil*. 114:249-255.
11. Cárdenas, C.Q.y.L. 2008. Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. *Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario*. 24:pags. 273-280
12. Cárdenas, L., A. Lovy-Wheeler, J.G. Kunkel, and P.K. Hepler. 2008. Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. *Plant Physiol*. 146:1611-1621.
13. Cárdenas, L., L. Vidali, J. Domnguez, H. Prez, F. Snchez, P.K. Hepler, and C. Quinto. 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to rhizobium etli nodulation signals. *Plant Physiol*. 116:871-877.
14. Cooper, J.A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 105:1473-1478.
15. Coronado P.R.E., Sánchez-Yáñez J. M., and P.-C.J.J.y.P.M. Z. 1995. Colonización de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) por *Rhizobium leguminosearum*. *TERRA*. 13:23-35.
16. Cvrckova, F., F. Rivero, and B. Bavlnka. 2004. Evolutionarily conserved modules in actin nucleation: lessons from *Dictyostelium discoideum* and plants. Review article. *Protoplasma*. 224:15-31.
17. Cyr, R.J. 1994. Microtubules in plant morphogenesis: role of the cortical array. *Annu Rev Cell Biol*. 10:153-180.
18. Charras, G.T., J.C. Yarrow, M.A. Horton, L. Mahadevan, and T.J. Mitchison. 2005. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature*. 435:365-369.
19. Cheung, A.Y., and H.M. Wu. 2004. Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *The Plant cell*. 16:257-269.

20. Chudakov, D.M., M.V. Matz, S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev.* 90:1103-1163.
21. Dominguez, R. 2009. Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 44:351-366.
22. dos Remedios, C.G., D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, and N.J. Nosworthy. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83:433-473.
23. Drubin, D.G., H.D. Jones, and K.F. Wertman. 1993. Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol Biol Cell.* 4:1277-1294.
24. El Sayed, K.A., D.T. Youssef, and D. Marchetti. 2006. Bioactive natural and semisynthetic latrunculins. *J Nat Prod.* 69:219-223.
25. En Tao Wang, Julio Martínez Romero, and I.L. Lara. 2001. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. En: Microbios. (Eds. E. Martínez Romero y J.C. Martínez Romero). Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>.
26. Era, A., M. Tominaga, K. Ebine, C. Awai, C. Saito, K. Ishizaki, K.T. Yamato, T. Kohchi, A. Nakano, and T. Ueda. 2009. Application of Lifeact reveals F-actin dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant & cell physiology.* 50:1041-1048.
27. Estrada-Navarrete, G., X. Alvarado-Affantranger, J.E. Olivares, G. Guillen, C. Diaz-Camino, F. Campos, C. Quinto, P.M. Gresshoff, and F. Sanchez. 2007. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Protoc.* 2:1819-1824.
28. Ferguson, B.J., A. Indrasumunar, S. Hayashi, M.H. Lin, Y.H. Lin, D.E. Reid, and P.M. Gresshoff. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol.* 52:61-76.

29. Foreman, J., V. Demidchik, J.H. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M.A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J.D. Jones, J.M. Davies, and L. Dolan. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422:442-446.
30. Gage, D.J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68:280-300.
31. Goddette, D.W., and C. Frieden. 1985. The binding of cytochalasin D to monomeric actin. *Biochem Biophys Res Commun*. 128:1087-1092.
32. Goddette, D.W., and C. Frieden. 1986. Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J Biol Chem*. 261:15974-15980.
33. Hardham, A.R., and B.E. Gunning. 1978. Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *J Cell Biol*. 77:14-34.
34. Hardham, A.R., and B.E. Gunning. 1979. Interpolation of microtubules into cortical arrays during cell elongation and differentiation in roots of *Azolla pinnata*. *J Cell Sci*. 37:411-442.
35. Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and a.J. Darnell. 2000. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
36. Heim, R., A.B. Cubitt, and R.Y. Tsien. 1995. Improved green fluorescence. *Nature*. 373:663-664.
37. Higaki, T., T. Sano, and S. Hasezawa. 2007. Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Current opinion in plant biology*. 10:549-556.
38. Kawska, A., K. Carvalho, J. Manzi, R. Boujemaa-Paterski, L. Blanchoin, J.L. Martiel, and C. Sykes. 2012. How actin network dynamics control the onset of actin-based motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:14440-14445.
39. Kost, B., P. Spielhofer, and N.H. Chua. 1998. A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J*. 16:393-401.

40. Li, Y., K. Sorefan, G. Hemmann, and M.W. Bevan. 2004. Arabidopsis NAP and PIR regulate actin-based cell morphogenesis and multiple developmental processes. *Plant Physiol.* 136:3616-3627.
41. Long, S.R. 1989. Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell.* 56:203-214.
42. Luders, J., and T. Stearns. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:161-167.
43. Mathur, J., N. Mathur, B. Kernebeck, and M. Hulskamp. 2003. Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. *The Plant cell.* 15:1632-1645.
44. McNulty, A.K., and M.J. Saunders. 1992. Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for plant nuclear lamins. *J Cell Sci.* 103 ( Pt 2):407-414.
45. McRae, S.R., C.L. Brown, and G.R. Bushell. 2005. Rapid purification of EGFP, EYFP, and ECFP with high yield and purity. *Protein Expr Purif.* 41:121-127.
46. Meiri, K.F. 2005. Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360:1663-1672.
47. Mori, I.C., and J.I. Schroeder. 2004. Reactive oxygen species activation of plant Ca<sup>2+</sup> channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol.* 135:702-708.
48. Morris, A., and J. Tannenbaum. 1980. Cytochalasin D does not produce net depolymerization of actin filaments in HEp-2 cells. *Nature.* 287:637-639.
49. Morton, W.M., K.R. Ayscough, and P.J. McLaughlin. 2000. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol.* 2:376-378.
50. Oda, T., K. Namba, and Y. Maeda. 2005. Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. *Biophys J.* 88:2727-2736.

51. Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-465.
52. Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*. 5:605-607.
53. Safer, D., T.R. Sosnick, and M. Elzinga. 1997. Thymosin beta 4 binds actin in an extended conformation and contacts both the barbed and pointed ends. *Biochemistry*. 36:5806-5816.
54. Sanaratne R., A.C.G.H. 1987. Effect of combined nitrogen fixation of soybean (*Glycine ma L. Marill*) as affected by cultivar and Rhizobial strains. *. Plant and Soil*. 103:45-50.
55. Sánchez-Yáñez, L.O.H.A.y.J.M. 1991. Manual de Microbiología del suelo. 113-120.
56. Shaner, N.C., R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N. Giepmans, A.E. Palmer, and R.Y. Tsien. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 22:1567-1572.
57. Shaner, N.C., G.H. Patterson, and M.W. Davidson. 2007. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci*. 120:4247-4260.
58. Sheahan, M.B., C.J. Staiger, R.J. Rose, and D.W. McCurdy. 2004. A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of *Arabidopsis* fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiol*. 136:3968-3978.
59. Shibaoka, H., and R. Nagai. 1994. The plant cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 6:10-15.
60. Somerville, C. 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22:53-78.

61. Southwick, F.S. 2000. Gelsolin and ADF/cofilin enhance the actin dynamics of motile cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:6936-6938.
62. Spector, I., F. Braet, N.R. Shochet, and M.R. Bubb. 1999. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech*. 47:18-37.
63. Spector, I., N.R. Shochet, Y. Kashman, and A. Growseiss. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science*. 219:493-495.
64. Takagi, S., H. Takamatsu, and N. Sakurai-Ozato. 2009. Chloroplast anchoring: its implications for the regulation of intracellular chloroplast distribution. *J Exp Bot*. 60:3301-3310.
65. Takemoto, D., and A.R. Hardham. 2004. The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. *Plant Physiol*. 136:3864-3876.
66. Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 67:509-544.
67. van Rhijn, P., and J. Vanderleyden. 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev*. 59:124-142.
68. Van Troys, M., J. Vandekerckhove, and C. Ampe. 1999. Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification. *Biochim Biophys Acta*. 1448:323-348.
69. Vidali, L., and P.K. Hepler. 2001. Actin and pollen tube growth. *Protoplasma*. 215:64-76.
70. Vidali, L., C.M. Rounds, P.K. Hepler, and M. Bezanilla. 2009. Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells. *PloS one*. 4:e5744.
71. Wang, Y.S., C.M. Motes, D.R. Mohamalawari, and E.B. Blancaflor. 2004. Green fluorescent protein fusions to Arabidopsis fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots. *Cell motility and the cytoskeleton*. 59:79-93.

72. Welch, M.D., and R.D. Mullins. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:247-288.
73. Westphal, M., A. Jungbluth, M. Heidecker, B. Muhlbauer, C. Heizer, J.M. Schwartz, G. Marriott, and G. Gerisch. 1997. Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Curr Biol.* 7:176-183.
74. Winder, S.J., and K.R. Ayscough. 2005. Actin-binding proteins. *J Cell Sci.* 118:651-654.
75. Yokota, K., E. Fukai, L.H. Madsen, A. Jurkiewicz, P. Rueda, S. Radutoiu, M. Held, M.S. Hossain, K. Szczyglowski, G. Morieri, G.E. Oldroyd, J.A. Downie, M.W. Nielsen, A.M. Rusek, S. Sato, S. Tabata, E.K. James, H. Oyaizu, N. Sandal, and J. Stougaard. 2009. Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *The Plant cell.* 21:267-284.
76. Zeiger, T.A.E. 2002. Growth, Development, and Differentiation. *In Plant Physiology*:354–355.