



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Departamento de Biología Molecular de Plantas

**“La participación Beclina 1 (BECN1) durante la simbiosis entre
Phaseolus vulgaris y *Rhizobium*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
Biól. Neftaly de Jesús Cruz Mireles

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Federico Sánchez Rodríguez
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. Susana Castro Obregón
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Mario Arteaga Vázquez
Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Mecanismos involucrados en la simbiosis entre las leguminosas y rizobacterias	3
2.1.1 La comunicación inicial	3
2.1.2 La organogénesis del nódulo y la infección bacteriana	6
2.1.2.1 La organogénesis del nódulo.....	6
2.1.2.2 La infección bacteriana.....	8
2.1.3 El establecimiento de la simbiosis	10
2.1.4 La Fijación Simbiótica de Nitrógeno	13
2.1.5 La senescencia del nódulo	14
2.2 La dinámica de membranas durante la simbiosis entre leguminosas y rizobacterias	16
2.3 Beclina 1 tiene un papel importante en la dinámica de membranas	18
2.3.1 Beclina 1 forma complejos con PI3KC3 y Vps15	20
2.3.1.1 Beclina 1 participa en autofagia	22
2.3.1.2 Beclina 1 participa en procesos de tráfico vesicular	26
2.3.2 Beclina 1 y su regulación	27
3. ANTECEDENTES	30
4. JUSTIFICACIÓN	36
5. HIPÓTESIS	37
6. OBJETIVOS	38
5.1 Objetivo general.....	38
5.2 Objetivos específicos	38
6. MATERIALES Y MÉTODOS	39

6.1	Identificación y análisis <i>in silico</i> de la secuencia del gen de BECN1 en <i>P. vulgaris</i>	39
6.2	Construcción de un ARN de interferencia (ARNi) para dirigir el silenciamiento de <i>PvBECN1</i>	40
6.3	Cultivo de plantas de <i>P. vulgaris</i>	42
6.4	Transformación de <i>P. vulgaris</i> mediante <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599.	43
6.5	Inoculación de las raíces transgénicas con <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899.....	44
6.6	Análisis de raíces y nódulos transgénicos de <i>P. vulgaris</i> por microscopía óptica y confocal	45
6.7	Análisis de la expresión genética por RT-qPCR	46
6.8	Procesamiento y análisis de imágenes.....	48
7.	RESULTADOS	49
7.1	<i>Phaseolus vulgaris</i> tiene un homólogo de BECN1	49
7.2	<i>PvBECN1</i> tiene dos dominios proteicos.....	50
7.3	La abundancia de transcrito de <i>PvBECN1</i> varía en respuesta a la inoculación con <i>Rhizobium</i> y durante la ontogenia del nódulo	52
7.4	La pérdida de función de <i>PvBECN1</i> perjudica la progresión del hilo de infección (HI) en raíces de <i>P. vulgaris</i>	55
7.5	La pérdida de función de <i>PvBECN1</i> reduce el número de primordios y nódulos	60
7.6	La pérdida de función de <i>PvBECN1</i> cambia los niveles de expresión genes involucrados en autofagia y otras vías de tráfico vesicular	62
7.7	<i>PvBECN1</i> podría tener un papel importante durante la senescencia del nódulo como proteína de autofagia	64
7.8	El promotor de <i>PvBECN1</i> tiene sitios de unión a factores transcripcionales que responden a auxinas y a estrés inducido por calor, sales y patógenos.....	65
8.	DISCUSIÓN.....	68
9.	CONCLUSIONES.....	74
10.	PERSPECTIVAS.....	75

11. BIBLIOGRAFÍA.....	76
12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	86

1. RESUMEN

En todas las interacciones planta-microorganismo, tanto en las mutualistas como en las patogénicas, el tráfico vacuolar es un tema central emergente debido a que es requerido para el suministro local de nuevo material de membrana o para la entrega de cargo (proteínas o metabolitos secundarios) al sitio de interacción. Cada vez existe un mayor interés en el estudio de posibles reguladores del tráfico vacuolar en estas interacciones. Recientemente se ha demostrado que Beclina 1 (BECN1) es un regulador importante en eucariotas que contribuye de manera significativa en diferentes eventos que requieren de tráfico vesicular, el más estudiado ha sido la autofagia. En plantas, se sabe que BECN1 tiene un papel muy importante en interacciones patogénicas, pero nada se conoce sobre sus funciones posibles en las interacciones mutualistas como la que ocurre durante la simbiosis entre leguminosas y rizobacterias donde se sabe que se requiere de una dinámica de membranas enorme. El presente trabajo abordó el estudio del gen ortólogo de BECN1 en *Phaseolus vulgaris* (*PvBECN1*) y su papel durante la interacción con *Rhizoiium*. Se encontró que la abundancia de transcrito de *PvBECN1* varía en respuesta a la inoculación con *Rhizobium* y durante la ontogenia del nódulo, teniendo sus mayores aumentos pocas horas después de la inoculación y durante el periodo de Fijación Simbiótica de Nitrógeno. Por otro lado, la pérdida de función de *PvBECN1* perjudica la progresión del hilo de infección (HI) en raíces de *P. vulgaris*, lo cual provoca la reducción en el número de nódulos y primordios de nódulo. Asimismo, la pérdida de función de *PvBECN1* cambia los niveles de expresión genes involucrados en autofagia y otras vías de tráfico vesicular. También se encontró que *PvBECN1* podría tener un papel importante durante la senescencia del nódulo como proteína regula el reciclaje de nutrientes por autofagia, y que esta proteína podría ser regulada transcripcionalmente por factores que responden a diferentes tipos de estrés entre los que destacan calor, sales y patógenos. Estos resultados sugieren que BECN1 podría tener un papel importante como regulador de la simbiosis.

2. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) es una de las leguminosas de mayor consumo humano a nivel mundial (Broughton *et al.*, 2003). Esta especie incluye a una enorme cantidad de variedades que, en conjunto, proporcionan cerca de un tercio de las proteínas en la dieta diaria de algunas culturas, particularmente en África y América (Gaut, 2014). Es uno de los cultivos más antiguos en México y Mesoamérica, data de más de 6000 años, e incluso se considera a México como uno de los centros de domesticación del frijol y como el país donde existe mayor diversidad del género *Phaseolus* (Bitocchi *et al.*, 2012; Gaut, 2014).

Una característica importante de esta leguminosa es la capacidad que tiene de establecer simbiosis con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno conocidas genéricamente como *rizobacterias* o *rizobios* (Kneip, Lockhart, Voss, & Maier, 2007). La simbiosis es una relación interespecífica que se define como la interacción estrecha entre dos organismos donde existen beneficios para ambos (G. E. D. Oldroyd, Murray, Poole, & Downie, 2011). Entre leguminosas y rizobacterias, esto involucra un intercambio donde la planta proporciona carbono reducido y todos los nutrientes esenciales requeridos para el metabolismo bacteriano, a cambio del nitrógeno reducido en forma de amonio por la bacteria y que será utilizado para la síntesis de biomoléculas. Para que este intercambio se lleve a cabo, es necesaria la formación de un nuevo órgano en la planta conocido como *nódulo*.

En general, esta manera de incorporar nitrógeno atmosférico (N₂) en las leguminosas se conoce como la *Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN)*. Este proceso requiere de una exquisita integración del metabolismo de la bacteria y la planta donde los transportadores tanto vegetales como bacterianos son muy importantes para transferir una gran cantidad de elementos y compuestos a través de las diferentes membranas. La FSN inyecta a los sistemas agrícolas aproximadamente 40 millones de toneladas de nitrógeno cada año (Udvardi & Poole, 2013).

A diferencia de la Fijación de Nitrógeno Industrial, la FSN de las leguminosas es benéfica con el ambiente. Es por ello que las leguminosas se han usado por miles de años en la rotación de cultivos, ya que ofrecen nitrógeno fijado residual a los subsecuentes sembradíos. Debido a todas estas implicaciones económicas, sociales y ecológicas, la FSN ha sido objeto de investigación por décadas, donde los esfuerzos se han encaminado al entendimiento de sus bases moleculares y genéticas con el objetivo de mejorar este proceso y extenderlo a plantas no leguminosas de importancia económica como los cereales.

2.1 Mecanismos involucrados en la simbiosis entre las leguminosas y rizobacterias

Para que la simbiosis entre leguminosas y rizobacterias pueda llevarse a cabo, es necesaria la formación del nódulo, lo cual involucra procesos celulares complejos para la internalización de la bacteria dentro de las células del córtex de la raíz. Una vez que el nódulo se ha constituido, los rizobios, a través de su complejo multienzimático conocido como *nitrogenasa*, adquieren la función de convertir el nitrógeno atmosférico (N_2) en un compuesto asimilable para la planta como el amonio (NH_4^+). A su vez, la planta provee a los rizobios de esqueletos de carbono (principalmente ácidos dicarboxílicos como el malato) para que lleven a cabo sus funciones vitales. De esta forma, las leguminosas proporcionan a los animales y humanos más de un tercio de sus necesidades nutricionales de nitrógeno (Gaut, 2014).

Durante la ontogenia del nódulo, toman lugar diversos procesos de señalización específica y altamente regulada. Es por ello que a continuación se describirá cada uno de ellos.

2.1.1 La comunicación inicial

Esta interacción mutualista se inicia en la *Rizósfera*, la zona del suelo inmediata a la raíz, con un intercambio de señales entre la planta y la bacteria cuando existe carencia de nitrógeno en el suelo. Inicialmente, la leguminosa libera *flavonoides* como naringenina, genisteína y daidzeína, así como ácidos aldónicos y betaínas, los cuales sirven para atraer a los rizobios hacia la región apical de los pelos radicales (Fig. 1).

Cuando los compuestos flavonoides secretados por la planta son reconocidos por los rizobios, la bacteria inicia la transcripción de genes específicos conocidos como genes de nodulación (genes *nod*) (Fig. 1). Este proceso involucra al regulador transcripcional NodD, una proteína de unión a DNA que se encuentra unida a regiones conservadas “río arriba” en los operones *nod* inducibles, éstas regiones son conocidas como “Cajas *nod*” (van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Al entrar en contacto con los flavonoides, NodD modifica su conformación permitiendo que la RNA polimerasa transcriba los genes *nod*. La traducción de los genes *nod* da como resultado la producción de un conjunto de enzimas encargadas de la síntesis y secreción de un grupo de compuestos denominados *Factores de Nodulación* (Factores Nod), los cuales son la molécula señal que promueve la nodulación en las raíces de las leguminosas (G. E. D. Oldroyd *et al.*, 2011).

La mayoría de los Factores Nod descritos hasta ahora consisten de un esqueleto básico de 3, 4 ó 5 residuos de N-acetil-D-glucosamina modificados químicamente y unidos por enlaces β -1,4. No todos los rizobios sintetizan los mismos Factores Nod, lo cual hace posible que se pueda establecer específicamente la simbiosis con una especie determinada de leguminosa. Los Factores Nod se unen a receptores tipo cinasa específicos en la planta (NFR1/NFR5) para disparar oscilaciones de Ca^{2+} , las cuales activan genes involucrados en el desarrollo del nódulo (Broghammer *et al.*, 2012). De esta manera, el reconocimiento de los Factores Nod dispara el crecimiento polarizado de la punta del pelo radical, la invaginación asociada a la infección bacteriana y la diferenciación y división de las células corticales de la raíz; dirigiendo así a la formación del meristemo de nódulo (G. E. D. Oldroyd *et al.*, 2011). Por todo lo

antes descrito, se puede afirmar que los flavonoides secretados por la planta y la subsecuente producción de los Factores Nod por la bacteria, son las moléculas señalizadoras encargadas de la especificidad y el establecimiento de la simbiosis.

Para que los Factores Nod puedan predisponer a la raíz para el ingreso de la rizobacteria, es necesaria la inducción de rearrreglos del citoesqueleto. Se sabe que los microtúbulos y la actina actúan en las plantas, de manera general, para establecer la dirección de la expansión celular (Petrásek & Schwarzerová, 2009), lo cual resulta importante al inicio de la simbiosis. Por ejemplo, se ha visto que ocurren cambios en la organización de los microtúbulos cuando se exponen de 3-10 min a Factores Nod (Weerasinghe, Collings, Johannes, & Allen, 2003). Asimismo, se ha reportado que la desestabilización de los microtúbulos conduce a la pérdida de direccionalidad del crecimiento del pelo radical (Bibikova, Blancaflor, & Gilroy, 1999).

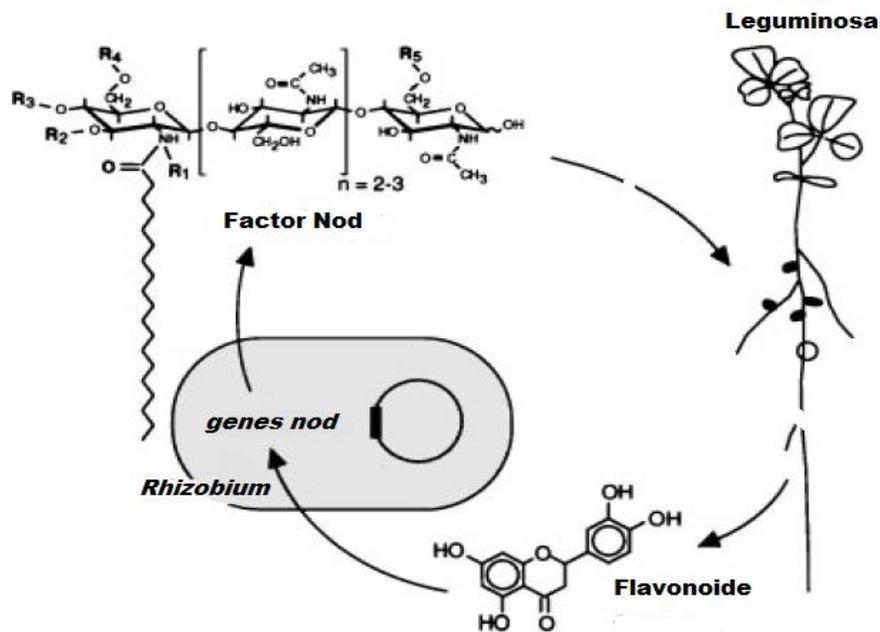


Figura 1. La comunicación inicial entre la rizobacteria (*Rhizobium*) y las leguminosas. Los flavonoides inducen a los *genes nod* del *Rhizobium*. Esto dirige a la producción de lipoquitooligosacáridos (Factores Nod) que inducen la formación del nódulo, los cuáles son modificados diferencialmente dependiendo de la especie de rizobia (Modificado de Schultze & Kondorosi, 1998).

Por otro lado, la actina es requerida para el crecimiento del pelo radical. Esta es formada y reorganizada a través de la polimerización de monómeros de actina G y de la nucleación de nuevos filamentos vía la acción del complejo ARP2/3 (Smith & Oppenheimer, 2005). Durante la simbiosis, la activación de ARP2/3 requiere de la acción del complejo SCAR/ WAVE. En leguminosas, mutaciones en *NAP1* y *PIR1* (componentes del complejo SCAR/ WAVE) presentan rearrreglos deficientes de filamentos de actina en presencia de Factores Nod, lo cual bloquea la infección por las rizobacterias; además, el crecimiento de pelos radicales y tricomas se ve alterado (Miyahara *et al.*, 2010; Yokota *et al.*, 2009). Estos resultados demuestran que la dinámica del citoesqueleto es determinante durante la entrada del rizobio al pelo radical y su posterior establecimiento en el córtex de la raíz.

2.1.2 La organogénesis del nódulo y la infección bacteriana

Después de la comunicación química inicial, tienen lugar de manera coordinada la infección bacteriana y la organogénesis del nódulo. En primer lugar, ocurre la división celular en el córtex y el periciclo, proceso que precede a la iniciación de los eventos de infección. Por otro lado, las bacterias son atrapadas en los pelos radicales curvados, y desde este sitio empiezan a progresar los *hilos de infección* (HI) (Fig. 2). El camino del HI es pre-establecido por hilos de pre-infección que son subdominios citoplasmáticos densos que se alinean con el citoesqueleto (Timmers, Auriac, & Truchet, 1999). A continuación se describirá como se llevan a cabo estos procesos.

2.1.2.1 La organogénesis del nódulo

Los nódulos son la culminación de un programa de desarrollo que se activa en la superficie de las raíces de las leguminosas al percibir los Factores Nod sintetizados por las rizobia. Un grupo de varios genes es el que se encuentra involucrado en la transducción de señales río abajo de la percepción de los

Factores Nod. Estos genes integran la llamada *Vía Común de Señalización de Simbiosis* (Vía Sym), que además son responsables de la simbiosis de las Microrrizas Arbusculares (MA). Las MA son una asociación simbiótica que se estima surgió hace aproximadamente 400 millones de años atrás y, por tanto, es mucho más antigua a la de las leguminosas y rizobacterias (Gutjahr & Parniske, 2013). Por ello, se tiene la hipótesis de que la nodulación simbiótica surgió de la evolución de una combinación de tres módulos transcripcionales diferentes: aquellos que dieron origen a la simbiosis de MA, los que se originaron de la señalización del nitrato y aquellos que se originaron del desarrollo de raíces laterales (Soyano & Hayashi, 2014).

De manera particular, los Factores Nod se unen a receptores tipo cinasa específicos que se encuentran sobre la membrana plasmática y que disparan una vía de señalización de calcio, la cual activa la transcripción de genes que están involucrados en el desarrollo del nódulo (Broghammer *et al.*, 2012). Esta señalización dirige a la diferenciación y división de las células corticales de la raíz, la cual en algunas especies da origen a nódulos determinados como los de *P. vulgaris* (esféricos, sin meristemos persistentes), y en otras a nódulos indeterminados como los de *Medicago truncatula* (elongados o ramificados, tienen uno o más meristemos persistentes). En ambos casos, existen múltiples capas celulares que separan el sitio inicial de contacto con la bacteria en la superficie de la raíz, del sitio de división celular en el córtex que dirige a la formación del *primordio de nódulo*. Se piensa que el reconocimiento de Factores Nod en la superficie de la raíz es suficiente para activar la organogénesis del nódulo en el córtex, y que esto debe involucrar alguna señal difusible además de la integración de la señalización hormonal (particularmente auxinas y citocininas) (G. E. D. Oldroyd *et al.*, 2011).

De manera general, todos los genes de la planta que se inducen inicialmente en presencia de las rizobia y también durante el desarrollo del nódulo, han sido referidos como *nodulinas* (Denancé, Szurek, & Noël, 2014). De acuerdo a su expresión espacio-temporal durante el desarrollo del nódulo, se clasifican en

nodulinas tempranas (antes de la fijación de nitrógeno) y *nodulinas tardías* (después de iniciada la fijación de nitrógeno).

2.1.2.2 La infección bacteriana

Para que las bacterias puedan colonizar las células del parénquima de la raíz de las leguminosas y más tarde constituir el nódulo, deben atravesar la epidermis y el córtex para tener acceso al primordio de nódulo en desarrollo, sitio donde las bacterias serán liberadas y donde posteriormente realizarán la FSN. En el caso de frijol, la infección bacteriana ocurre vía los pelos radicales, principalmente a través de la formación de los HI (G. E. D. Oldroyd *et al.*, 2011) (Fig. 2). Se sabe que las puntas de los pelos radicales que están emergiendo son los sitios preferidos de unión por las rizobacterias (Emerich & Krishnan, 2014). Cuando los pelos radicales perciben los Factores Nod, ocurre la interrupción del crecimiento simétrico polar, y algunas veces esto es acompañado por la hinchazón de la punta del pelo radical, después de lo cual el crecimiento se reanuda para formar una especie de ramificación (Esseling, Lhuissier, & Emons, 2003). Este cambio morfológico ayuda a atrapar a las bacterias localizadas en esta zona y a generar un sitio de crecimiento bacteriano hacia adentro del pelo radical llamado *bolsillo de infección* (Geurts, Fedorova, & Bisseling, 2005). Desde este sitio las bacterias continúan dividiéndose y formando colonias que son conocidas como *focos de infección*, que permiten iniciar el desarrollo del HI (Oldroyd *et al.*, 2011).

Los HI son estructuras derivadas de la planta e inducidas por los Factores Nod que se invaginan hacia el interior de las células de la raíz formando un conducto parecido a un tubo que le permite a la bacteria moverse y dividirse desde la superficie hasta la región cortical de la raíz (Oldroyd, 2001). Durante la iniciación del HI, existen enzimas vegetales que participan en la degradación de la pared celular sin causar la ruptura de la célula para permitir el paso de las rizobacterias. Éstas incluyen pectin-metiltransferasas y poligalacturonidasas, las cuales tienen homólogos que son expresados durante el crecimiento del tubo polínico, sugiriendo una función de crecimiento polarizado (Muñoz *et al.*, 1998; Rodríguez-

Llorente *et al.*, 2004). La prevención del contacto entre el citoplasma de la célula vegetal y el rizobio resulta muy importante, ya que de esta manera se evita la respuesta de defensa de la planta. El hecho de que el HI se forme de material de la pared celular depende del tráfico vesicular intracelular, un proceso regulado por GTPasas pequeñas y por moléculas de señalización como los *fosfatidilinosítidos* (Jurgens, 2004; Xuemin Wang, 2004).

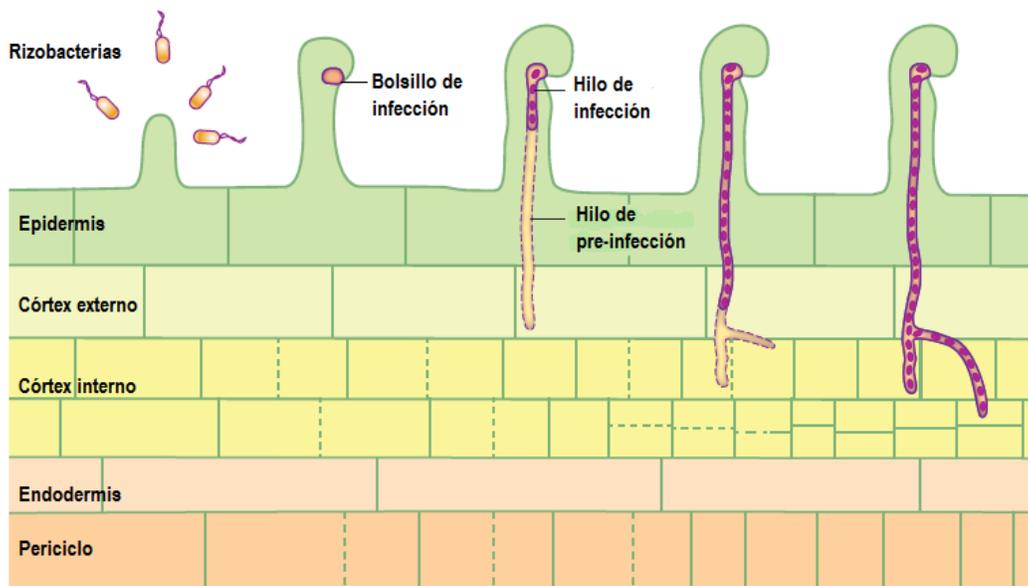


Figura 2. La infección bacteriana. La división celular en el córtex y periciclo se inicia muy temprano en la interacción entre la raíz y la rizobacteria y precede a la iniciación de los eventos de infección. La bacteria es atrapada en el pelo radical encorvado y desde este sitio se inicia el Hilo de Infección (HI). La ruta del HI es pre-establecida por los hilos de pre-infección. El HI progresa al interior del córtex donde el primordio de nódulo se ha formado a través varias series de división celular (Modificado de Oldroyd *et al.*, 2011).

El HI se alarga hasta la región cortical central de la raíz, allí se ramifica y deposita las bacterias en los sacos membranosos llamados *simbiosomas*. Aunque los detalles del crecimiento del HI aún no se comprenden del todo, se sabe que el citoesqueleto también juega un papel importante. Los microtúbulos ayudan a determinar la dirección del crecimiento a los sitios de flujo de Ca^{+2} (Bibikova *et al.*, 1999), y la actina ofrece la infraestructura para la entrega de vesículas en el sitio del crecimiento de pelos radicales (Samaj, Müller, Beck, Böhm, & Menzel, 2006;

Xiaohua Wang *et al.*, 2006). Además, se sabe que la actina participa en la iniciación y se especula que en la progresión del HI (Oldroyd *et al.*, 2011).

Se postula que cuando las rizobia llegan a las células del primordio del nódulo son exocitados del HI y al mismo tiempo internalizados en las células del primordio por un proceso de tipo endocitosis. La endocitosis de la bacteria requiere del contacto físico entre la membrana de la bacteria y el glicocálix de la planta (Brewin, 2004; Udvardi & Poole, 2013). Aunque se sugiere que la internalización de los rizobia en los simbiosomas se debe a la existencia de un proceso parecido a la endocitosis, el estudio de marcadores de membrana en la formación de varios compartimentos endocíticos, como las GTPasas pequeñas Rab5 y Rab7, no muestran ninguna asociación con reguladores importantes de etapas tempranas de la formación del simbiosoma. Se ha visto en *M. truncatula* que los simbiosomas no requieren de Rab5 en ninguna etapa de su desarrollo. Sin embargo, Rab7 aparece en el simbiosoma desde etapas tempranas del desarrollo hasta la senescencia (Limpens *et al.*, 2009). Por ello, se piensa que durante el desarrollo del simbiosoma parece estar involucrada solo una parte de la maquinaria de endocitosis.

En conjunto, todos estos procesos celulares que ocurren inmediatamente después del diálogo inicial entre las rizobacterias y las leguminosas e inducidos en su mayoría por la presencia de los factores Nod, resultan muy importantes para el establecimiento de las rizobia en el nuevo órgano que más tarde será el encargado de la FSN. Esta coordinación casi simultánea de la organogénesis del nódulo y la progresión de la infección bacteriana debe ser estrictamente regulada, ya que la disrupción de uno u otro evento puede tener consecuencias costosas en la relación simbiótica.

2.1.3 El establecimiento de la simbiosis

Para que las rizobacterias puedan establecerse en el primordio de nódulo, debe ocurrir la formación de compartimentos membranosos especializados por parte del huésped, en el cual los rizobios son hospedados intracelularmente. Esta

membrana especializada que rodea al rizobio se llama membrana peribacteroidal (MPB) y representa una interface simbiótica por donde se facilita el intercambio de nutrientes y señales de una manera regulada. Por tanto, a través de la MPB se controla el flujo de carbono y nitrógeno desde y para los bacteroides, además del suministro de todos los elementos requeridos para el metabolismo bacteriano incluyendo fósforo, azufre, potasio, sodio, calcio, vanadio, hierro, molibdeno, níquel y cobalto (Rosendahl, Glenn, & Dilworth, 1991). Aunque por la MPB se importan y exportan una gran cantidad de señales y nutrientes, poco se conoce acerca de los transportadores que en ella se encuentran. Por ejemplo, en la MPB de todas las leguminosas estudiadas hasta ahora, se han encontrado transportadores de ácidos dicarboxílicos pero no se han identificado aún los genes que los codifican (Udvardi & Poole, 2013).

La MPB junto con los rizobios, diferenciados morfológicamente y funcionalmente en *bacteroides*, constituyen al *simbiosoma* que representa al compartimento celular especializado para la fijación biológica de nitrógeno en el nódulo. Puede haber más de un bacteroide por simbiosoma como sucede en los nódulos de *P. vulgaris*. Una vez dentro del simbiosoma, las rizobacterias continúan creciendo y dividiéndose hasta que las células infectadas alcanzan miles de simbiosomas; los cuales, se dividen y se diferencian en estructuras similares a organelos. Los cambios morfológicos y fisiológicos que sufren los rizobios dentro de estas estructuras y que son esenciales para su función nueva incluyen: el aumento en el tamaño, la endoreduplicación del DNA, el cese de la división celular de las bacterias y la expresión de la nitrogenasa, principalmente. Una característica interesante de los rizobios, es que sólo fijan nitrógeno cuando se diferencian en bacteroides y expresan al complejo de la nitrogenasa (Yang, Horvath, Hontelez, Kammen, & Bisseling, 1991). Se piensa que la diferenciación terminal de la bacteria en bacteroide está mediada por factores específicos derivados de plantas. Estudios recientes han identificado estos factores como NCR (*nodule-specific cysteine-rich*), que son péptidos que sólo están presentes en el grupo monofilético IRLC (Inverted Repeat-lacking Clade) de las leguminosas (Van de Velde *et al.*, 2010).

Una vez que las rizobacterias se han diferenciado en bacteroides al interior de los simbiosomas, entregan a la planta el control de la biosíntesis de sus compuestos esenciales. Esto significa que la bacteria se vuelve auxótrofa en simbiosis, ya que, por ejemplo, apaga la síntesis de aminoácidos. Este fenómeno se conoce como *auxotrofia simbiótica* (Udvardi & Poole, 2013). Otra característica importante de los bacteroides es que están rodeados por *proteínas moonlighting* de origen eucariota y procariota pertenecientes a ambos simbiosomas y que se encuentran en el lumen del simbiosoma. Estas proteínas que interactúan de manera cooperativa, en su mayoría participan en el metabolismo del carbono y otras pocas están involucradas en el metabolismo del nitrógeno. Las proteínas moonlighting son aquellas que llevan a cabo funciones diferentes a las predichas, participando en un ambiente fisiológico inesperado. Esto podría sugerir que en los simbiosomas existen muchos más aspectos funcionales a los previamente descritos (Emerich & Krishnan, 2014).

Debido a que los simbiosomas funcionan como organelos transitorios, estos deben ser regenerados *de novo* durante cada ciclo de infección. Las células donde se ubican los simbiosomas se denominan *células infectadas* y pueden ocupar hasta un 80% del volumen total de la célula. Por ello, se estima que deben ser requeridas enormes cantidades de membrana para el desarrollo y mantenimiento de los simbiosomas (Bapaume & Reinhardt, 2012). Las células infectadas y las *no infectadas* (donde no hay simbiosomas) tienen diferentes funciones metabólicas además de diferente morfología y orientación espacial. Las pequeñas células no infectadas se encuentran intercaladas entre las grandes células infectadas, estas últimas además ocupan aproximadamente el 80% de la zona central del nódulo (Emerich & Krishnan, 2014).

Hay mucho que discutir con respecto a la biogénesis, desarrollo y evolución del simbiosoma. Se tiene la hipótesis de que la vía endocítica que controla la formación de la interface simbiótica entre las leguminosas y rizobacterias (es decir, de la formación de la MPB) es la misma que favorece la formación de ésta interface en micorrizas arbusculares (Ivanov & Fedorova, 2012). También se piensa que los simbiosomas pueden ser considerados como organelos adquiridos

horizontalmente para la fijación de nitrógeno, lo que podría representar una fase intermedia en la evolución de un organelo vegetal con origen bacteriano como el cloroplasto (Van de Velde *et al.*, 2006).

2.1.4 La Fijación Simbiótica de Nitrógeno

Una vez que las rizobacterias han completado su programa de diferenciación en bacteroides al interior de los simbiosomas, se expresan los genes que componen el complejo de la nitrogenasa y empieza la fijación de nitrógeno. La nitrogenasa cataliza la reducción del amonio (NH_4^+) a través de múltiples reacciones de transferencia de electrones (J Kim & Rees, 1992). Por cada molécula de N_2 que se reduce en dos moléculas de NH_4^+ se requieren 16 moléculas de ATP y 8 electrones (Jones, Kobayashi, Davies, Taga, & Walker, 2007). Por lo tanto, los bacteroides requieren de un elevado flujo de oxígeno para permitir la síntesis de cantidades enormes de ATP durante el Ciclo de Krebs, lo cual debe lograrse manteniendo concentraciones bajas de este gas para evitar la inactivación de la nitrogenasa. Este complejo se encuentra en todos los organismos que fijan nitrógeno y representa un proceso ATP-dependiente (Kneip *et al.*, 2007).

En todas las leguminosas estudiadas hasta ahora, estas condiciones microaeróbicas en el nódulo son establecidas por una barrera de difusión de oxígeno y por la síntesis de la hemoproteína *leghemoglobina*. Las leghemoglobinas son las proteínas más abundantes en el nódulo y tienen la función de unirse con alta afinidad al oxígeno en el citoplasma y entregarlo rápidamente a la mitocondria y bacteroides de las células infectadas. Se piensa que posiblemente las concentraciones bajas de oxígeno y sus cambios asociados en los niveles redox celulares son señales importantes que inducen la expresión de genes para la fijación de nitrógeno (genes *nif*) y de sus procesos asociados (genes *fix*) durante el desarrollo del bacteroide (Oldroyd *et al.*, 2011).

Después del establecimiento de las condiciones necesarias para la FSN, se lleva a cabo el intercambio de carbono por parte de la planta y de nitrógeno por

parte de la rizobacteria. Por un lado, la planta provee carbono a los bacteroides en forma de ácidos dicarboxílicos, particularmente malato y succinato, los cuales se producen a partir de sacarosa a través de la *sacarosa sintasa* y enzimas glicolíticas. Y por otro, el amonio sintetizado por la bacteria es secretado a la planta como amidas (principalmente glutamina y asparaginas) o como ureidos para su asimilación (Dupont, Alloing, & Pierre, 2012). En *P. vulgaris*, el nitrógeno es exportado desde los nódulos principalmente en forma de ureidos. De hecho, en esta leguminosa ya se ha aislado y caracterizado un transportador de ureidos (PvUPS1) (Pélissier, Frerich, Desimone, Schumacher, & Tegeder, 2004). Por lo tanto, este intercambio de nutrientes entre ambos simbiosomas requiere de la presencia de transportadores tanto de ácidos dicarboxílicos como de compuestos nitrogenados en la membrana del simbiosoma. Sin embargo, poco se conoce al respecto o sobre formas alternativas de transporte como la existencia de difusión simple o la presencia de canales.

Por todo lo anterior, Udvardi, M. y Poole, P.S., 2013 establecen que el metabolismo del nitrógeno durante la FSN muestra algunas características universales como son:

1. El establecimiento de un ambiente microaeróbico en el nódulo. El cual es un pre-requisito importante para la fijación de nitrógeno por parte de la bacteria.
2. El transporte del carbono reducido de la planta a la rizobacteria. El cual ocurre principalmente como ácido dicarboxílico y en su mayoría en forma de malato.
3. El transporte del nitrógeno fijado de la rizobacteria a la planta. El cual se transporta principalmente como amonio.

Todo esto muestra como el funcionamiento del nódulo durante la FSN tiene muchas peculiaridades que involucran la integración del metabolismo bacteriano y vegetal en uno mismo.

2.1.5 La senescencia del nódulo

En todas las leguminosas, el periodo de fijación de nitrógeno es óptimo entre 4 y 5 semanas después de la infección. Después de este periodo, la capacidad de fijación de nitrógeno reduce, las células del nódulo senescen y la relación simbiótica se pierde. Por lo tanto, la duración de la relación simbiótica entre leguminosas y rizobacterias es un proceso relativamente corto. En las leguminosas de grano como soya, chícharo y frijol, el fenómeno de senescencia se lleva a cabo al mismo tiempo que el llenado de la vaina (Dupont *et al.*, 2012).

La senescencia del nódulo se dispara prematuramente por varios tipos de estrés o como una consecuencia del reconocimiento deficiente entre los simbiontes. En los nódulos determinados, como los que desarrolla frijol, la senescencia se desarrolla radialmente empezando del centro del nódulo y extendiéndose lentamente hacia afuera. A nivel ultraestructural, éste proceso empieza con la fusión del simbiosoma con compartimentos líticos (Van de Velde *et al.*, 2006), lo que provoca que el citoplasma sea menos electrodensito y la aparición de vesículas y restos de membranas como resultado de su desintegración (Timmers *et al.*, 2000).

Una característica de la senescencia del nódulo es que dispara una amplia variedad de actividades proteolíticas que causan la degradación de proteínas a gran escala (Pladys & Vance, 1993). Sin embargo, hasta la fecha las cascadas de transducción de señales y las funciones regulatorias que controlan la senescencia del nódulo se desconocen, lo único que se puede afirmar es que la senescencia del nódulo es un proceso muy complejo y regulado estrictamente (Van de Velde *et al.*, 2006).

Se piensa que el proceso de senescencia que describe el nódulo puede seguir un mecanismo paralelo con el de otros órganos en la planta. Tal como se observó en una comparación de las familias génicas representadas en el transcriptoma de senescencia en hoja de *Arabidopsis* y el proceso de senescencia del nódulo, donde se revela que hay una secuencia similar de eventos, ya que en ambos se encontraron familias de genes involucrados con catabolismo, transporte, estrés y respuestas de defensa, entre otros. De hecho, los cloroplastos y los

simbiosomas que son los blancos primarios de degradación durante senescencia para el reciclaje de nutrientes, en hoja y nódulo respectivamente, tienen muchas características en común desde el punto de vista evolutivo (Van de Velde *et al.*, 2006).

2.2 La dinámica de membranas durante la simbiosis entre leguminosas y rizobacterias

En todas las interacciones planta-microorganismo, incluidas tanto las mutualistas como las patogénicas, el tráfico vacuolar es un tema central emergente (Teh & Hofius, 2014) ya que es requerido para el suministro local de nuevo material de membrana o para la entrega de cargo (proteínas o metabolitos secundarios) al sitio de interacción (D. Wang & Dong, 2011; Yun & Kwon, 2012). Como se ha descrito aquí, durante la simbiosis entre leguminosas y rizobacterias ocurren eventos que requieren de una dinámica enorme de membranas. En este proceso, las membranas se encuentran involucrados a todos niveles, desde el reconocimiento inicial hasta el establecimiento del rizobio al interior de los simbiosomas y en la elaboración de su interface simbiótica. Incluso, hay autores que señalan que este sistema membranoso altamente organizado para la endosimbiosis es el núcleo de dicha interacción (Bapaume & Reinhardt, 2012).

Las membranas son un componente importante debido a que establecen condiciones controladas y separadas al interior de la célula. En el caso de la simbiosis, dos organismos que cooperan tan de cerca requieren de cantidades de membrana elevadas para separar sus funciones y establecer una interface simbiótica por la cual se pueda llevar a cabo el intercambio de nutrientes. En primer lugar, se ha visto que desde la formación del HI se requiere de la síntesis *de novo* de membrana y de proteínas con funciones específicas relacionadas con la señalización y transporte durante esta etapa inicial de la interacción. Desde hace ya muchos años, se ha descrito que el crecimiento del HI requiere de un tráfico vesicular intenso (Robertson & Lyttleton, 1982), demostrando así que

durante la infección y el acomodo del endosimbionte es necesaria la biosíntesis y el tráfico de membrana.

Asimismo, las adaptaciones que ocurren durante la transición de una célula cortical a una célula con maquinaria de simbiosis, requieren de la producción de una gran cantidad de membrana en el huésped y de proteínas especializadas de membrana para la comunicación simbiótica y el intercambio de nutrientes (Bapaume & Reinhardt, 2012). Por ejemplo, se ha visto que la superficie de contacto que existe entre el bacteroide y la planta es enorme, y que puede llegar a aumentar hasta 20 veces en el caso de nódulos que se encuentran llenos de bacterias que están fijando nitrógeno (Verma, Kazazian, Zogbi, & Bal, 1978). Además, similar a lo que sucede con este sistema de endomembranas, existe un aumento en la cantidad de organelos como el retículo endoplásmico (RE), plástidos y mitocondrias (Fournier *et al.*, 2008).

Por otro lado, la autofagia, un proceso particular de tráfico vesicular, es cada vez más reconocida como una vía importante en la regulación de las interacciones planta-microorganismo. En este contexto, su estudio se ha dirigido principalmente en la respuesta a patógenos donde se le ha atribuido un papel fundamental en la respuesta inmune en plantas (Hayward & Dinesh-Kumar, 2011; Liu *et al.*, 2005; Patel & Dinesh-Kumar, 2008; Seay, Patel, & Dinesh-Kumar, 2006). La autofagia es un proceso catabólico por el que las células degradan porciones de su propio citoplasma. Este proceso se encuentra conservado entre levaduras, animales y plantas (Bassham *et al.*, 2006), y aunque se sabe que la autofagia está activa a niveles basales bajo condiciones fisiológicas normales, puede ser estimulada por diversos tipos de estreses incluyendo daño celular, inanición de nutrientes e infección por patógenos (Levine & Klionsky, 2004). Sin embargo, pese a que la autofagia pudiera participar de manera importante durante la simbiosis entre leguminosas y rizobacterias, no se conoce nada al respecto.

Debido a que para que ocurra la autofagia es necesaria la entrega de membrana y una serie de fusiones homotípicas y heterotípicas con otros compartimentos celulares, se piensa que el tráfico de membranas juega un papel fundamental en la regulación y ejecución del proceso de autofagia. De hecho,

existen proteínas que además de jugar un papel importante durante la autofagia, se ha demostrado que contribuyen de manera significativa en otras vías de tráfico vesicular en levaduras, mamíferos y plantas. Todo esto sugiere que existe una interconexión conservada entre reguladores de tráfico de membrana y de autofagia (Teh & Hofius, 2014).

Dentro de estas proteínas importantes que han sido relacionadas con autofagia y otros tipos de tráfico vesicular se encuentra Beclina1 (BECN1). Esta proteína forma distintos complejos con la *fosfatidilinositol 3-Cinasa Clase III* (PI3KC3/VPS34) que participan en la regulación del proceso de autofagia y de otras vías de tráfico de membranas (Funderburk, Wang, & Yue, 2010). A continuación se describirá a detalle el conocimiento que se tiene sobre esta proteína interesante.

2.3 Beclina 1 tiene un papel importante en la dinámica de membranas

Beclina1 (BECN1) es una proteína de eucariotas superiores ortóloga a ATG6/VPS30 de levadura (Kihara, Kabeya, Ohsumi, & Yoshimori, 2001). Sus funciones han sido estudiadas mayormente en levadura y mamíferos, y se ha visto que participa en numerosos procesos biológicos, incluyendo inmunidad, desarrollo, supresión de tumores, adaptación a estrés, endocitosis, citocinesis, senescencia y muerte celular (He & Levine, 2010). En mamíferos, BECN1 se expresa en muchos tejidos y se localiza principalmente en estructuras citoplasmáticas que incluyen el RE, mitocondria y la membrana perinuclear (Kang, Zeh, Lotze, & Tang, 2011).

Aunque BECN1 no tiene una función enzimática conocida, gobierna los múltiples eventos de señalización celular en los que participa a través de funcionar como una proteína de andamiaje (Fogel *et al.*, 2013). Muchas de las funciones que lleva a cabo BECN1 dependen de su unión a la cinasa PI3KC3, homólogo de Vps34 en levadura. En células de mamífero, se ha observado que aproximadamente el 50% de PI3KC3 se encuentra unida a BECN1 cuando se co-

inmunoprecipitan ambas proteínas (Furuya, Byfield, Pattingre, & Levine, 2005). De esta manera, cuando BECN1 forma complejos con PI3KC3, juega un papel fundamental en la autofagia y otros procesos que involucran tráfico vesicular regulando la síntesis del *fosfatidilinositol 3-fosfato* (PI3P), el cuál es producto de la actividad de PI3KC3 (Rameh & Cantley, 1999).

BECN1 fue primero identificada en mamíferos como un interactor de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Liang *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 1999). Se ha observado que tal interacción es importante para mantener un balance entre muerte celular y supervivencia celular (Pattingre *et al.*, 2005). De hecho, se ha reportado recientemente que la interacción BECN1-Bcl-2 está involucrada en la regulación de autofagia y apoptosis en mamíferos (Sinha & Levine, 2008). Aunque en plantas no se han encontrado homólogos de Bcl-2, se sugiere que otras proteínas podrían llevar a cabo esta conexión entre muerte y supervivencia, por ejemplo, las asociadas a la *Muerte Celular Programada por Respuesta Hipersensible* (MCP RH) que están relacionadas con supervivencia por autofagia (Seay *et al.*, 2006).

BECN1 de mamífero es una proteína de 60 kDa que contiene tres dominios estructurales identificados: un dominio BH3 en la posición N- terminal, un dominio central CCD (*coiled coil domain*) y un dominio conservado evolutivamente ECD (*evolutive coserved domain*) (Wirawan *et al.*, 2012). Además, se ha reportado que contiene una secuencia corta de aminoácidos rica en leucinas que es responsable de su exportación al núcleo (NES, nuclear export signal) (Kang *et al.*, 2011). Debido a la presencia de los dominios BH3 y CCD, BECN1 tiene la capacidad de auto-asociarse y formar homo-oligómeros (Adi-Harel *et al.*, 2010). Se propone que esta característica le sirve para formar una plataforma que permite la nucleación rápida de las proteínas asociadas a BECN1 (Kang *et al.*, 2011). Por otro lado, BECN1 se une a PI3KC3 a través del dominio ECD, lo que permite el subsecuente reclutamiento de proteínas ATG adicionales que orquestan la formación del autofagosoma (Kihara, Kabeya, *et al.*, 2001). Varios reportes recientes han sugerido que estos dominios son los que permiten a BECN1 realizar múltiples interacciones con otras proteínas y, así, participar en diversos procesos de

señalización celular (Furuya *et al.*, 2005; Pattingre *et al.*, 2005; Sinha & Levine, 2008).

2.3.1 Beclina 1 forma complejos con PI3KC3 y Vps15

Como se mencionó anteriormente, BECN1 se encuentra involucrada en varios procesos fisiológicos y patológicos a través de regular de manera coordinada la formación de complejos multiproteicos que participan en autofagia o en tráfico de membranas. Hasta ahora, la mayoría de las funciones descritas para BECN1 dependen de los complejos que forma con las cinasas VPS15 y PI3KC3. VPS15 es una serin/treonin cinasa que interactúa con PI3KC3 para regular su actividad (Stack, Herman, Schu, & Emr, 1993). Esta proteína se encuentra anclada a la membrana por medio de un ácido mirístico que está unido a su extremo N-terminal (Kihara, Noda, Ishihara, & Ohsumi, 2001). Por otro lado, PI3KC3 es una cinasa cuya presencia se encuentra conservada desde levadura hasta plantas y mamíferos (Bassham *et al.*, 2006; Seay *et al.*, 2006), como sucede con BECN1. La PI3KC3 es una enzima asociada a membrana que regula los niveles de fosfoinosítidos en la célula. Su producto, el PI3P, tiene funciones importantes en el tráfico endocítico y fagocítico, y es requerido durante la iniciación y progresión de la autofagia. En todos estos procesos, PI3P parece crear plataformas que sirven para reclutar efectores específicos para eventos de tráfico de membranas (Burman & Ktistakis, 2010).

Existen principalmente dos complejos multiproteicos en los que participa BECN1 junto a VPS15 y PI3KC3 que se encuentran altamente conservados entre mamíferos y levaduras (Wirawan *et al.*, 2012). El *complejo I* lo constituyen VPS15, PI3KC3, BECN1 y ATG14 y se ha visto que participa en el proceso de autofagia. Mientras tanto, el *complejo II* lo conforman VPS15, PI3KC3, BECN1 y VPS38 y está involucrado en la vía VPS (*Vacuolar Protein Sorting*) (Kihara, Noda, *et al.*, 2001; Obara, Sekito, & Ohsumi, 2006). VPS15, PI3KC3 y BECN1 constituyen el núcleo de estos complejos cuya especificidad está determinada por la presencia de las proteínas ATG14 y VPS38, las cuales están asociadas de manera exclusiva

al complejo I o II, respectivamente. Se sabe que ATG14 y VPS38 juegan un papel en permitir a BECN1 y PI3KC3 la formación del complejo. ATG14 es requerida para la localización del complejo I a la *estructura pre-autofagosomal* (PAS), mientras que VPS38 es responsable de la localización endosomal del complejo II (Obara *et al.*, 2006).

En levadura, el Complejo II es más abundante que el Complejo I, lo que sugiere que el núcleo PI3KC3-VPS15-BECN1 se encuentra involucrado principalmente en la vía VPS bajo condiciones normales y que la autofagia es estrictamente regulada a niveles basales (Kang *et al.*, 2011). En mamíferos, cada vez se identifica un mayor número de proteínas que se unen al complejo BECN1-PI3KC3-VPS15, donde cada uno de los nuevos complejos que se forman parecen reciclar varios elementos derivados de otros procesos celulares (Kang *et al.*, 2011). Por lo tanto, a diferencia de lo que sucede en levadura, los complejos I y II en mamíferos contienen un mayor número de proteínas asociadas que no se encuentran exclusivamente limitadas a una función específica (Jimi Kim *et al.*, 2013). En cambio, en plantas, solo se sugiere la existencia de estos complejos por homología de proteínas. A pesar de las funciones fundamentales que desempeñan ambos complejos en la célula, se sabe poco sobre su formación y sobre cómo ejercen su especificidad funcional (Obara & Ohsumi, 2011).

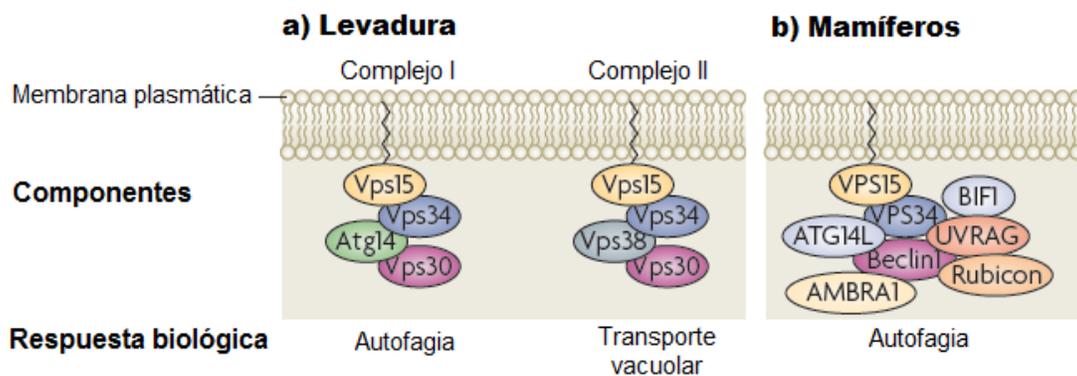


Figura 3. Complejos Vps15-PI3KC3 en mamíferos y levadura. a) En levadura, PI3KC3 (Vps34), Vps15 y BECN1 (Vps30) se encuentran unidos tanto a una proteína relacionada con autofagia (Vps14) formando el "Complejo I", como a una proteína relacionada con el transporte vacuolar (Vps38) formando el "Complejo II". b) En mamíferos, el complejo que forman PI3KC3 (Vps34), Vps15 y BECN1 (Beclin 1) es más elaborado, con componentes adicionales que no están presentes en los complejos de levadura (Modificado de Vanhaesebroeck, Guillermet-Guibert, Graupera, & Bilanges, 2010).

Aunque en plantas se sabe poco sobre los mecanismos celulares en los que participa BECN1 y aún no se ha establecido si también forma complejos con VPS15 y PI3KC3 como en levaduras y mamíferos, es muy probable que así suceda por lo altamente conservados que se encuentran en la escala evolutiva los mecanismos en los que participan estos complejos. En *Arabidopsis* sólo se ha encontrado un gen de BECN1 el cual, junto con PI3KC3, participan durante la formación del autofagosoma. Este gen cuenta con dos sitios aparentes de empalme pero no se sabe si ambas variantes se expresan al mismo tiempo, en el mismo lugar y/o si ambas producen proteínas funcionales (Bassham *et al.*, 2006).

2.3.1.1 Beclina 1 participa en autofagia

Autofagia, una palabra griega que significa “*comerse a sí mismo*”, es un proceso de degradación celular altamente conservado en eucariotas por el cual proteínas citoplasmáticas dañadas y organelos son llevados al lisosoma para su destrucción hasta aminoácidos y nucleótidos que pueden ser reciclados por la célula (C. Wang, Wang, McNutt, & Zhu, 2011). Ésta puede ser inducida por múltiples tipos de estrés incluyendo daño celular, carencia de nutrientes o ataque de patógenos (Levine & Klionsky, 2004). Incluso, para mantener la homeostasis celular, se requieren niveles basales de autofagia. De acuerdo con Bassham, D., *et al*, 2006 existen al menos tres tipos de autofagia:

- **Autofagia mediada por chaperonas:** Es independiente de vesículas, emplea receptores especiales que reclutan proteínas blanco individuales y promueven su importación directa al lisosoma. Esta vía es mediada por chaperonas y aún no ha sido reportada en plantas.
- **Microautofagia:** Ocurre por invaginación del tonoplasto o lisosoma, en los que se liberan vesículas intravacuolares llamadas *cuerpos autofágicos*, que contienen material citoplasmático. El rompimiento de la membrana de los cuerpos autofagicos expone su contenido a las hidrolasas vacuolares.

- **Macroautofagia:** Atrapa porciones citoplasmáticas en vesículas formadas *de novo*. Estas surgen por expansión de una membrana en forma de copa llamada *fagóforo* (o membrana aislada), el cual engulle citoplasma y al final se sella para generar autofagosomas de doble membrana. La membrana externa del autofagosoma se fusiona eventualmente con el tonoplasto o lisosoma para liberar la vesícula interna como *cuerpo autofágico*.

El tipo de autofagia a la que se hará mención de ahora en adelante es a la macroautofagia (que será referida como autofagia). Anteriormente se pensaba que la autofagia era una vía de degradación inespecífica, sin embargo; el reciente descubrimiento de proteínas de reclutamiento que atan un cargo específico a la envoltura de las vesículas autofágicas ha modificado este punto de vista. Ahora se sabe que la autofagia puede ser un proceso altamente selectivo. La autofagia específica promueve el recambio de organelos enteros como mitocondrias, peroxisomas y cloroplastos, y de complejos grandes cuando no funcionan adecuadamente o son innecesarios (por ejemplo, ribosomas y proteasomas). Además, la autofagia mantiene los agregados proteicos por debajo de los niveles tóxicos (F. Li & Vierstra, 2012).

El estudio de la autofagia en levadura y mamíferos ha revelado vías canónicas para este proceso que involucran cinasas de proteínas, cinasas de lípidos y centros de conjugación de proteínas. De acuerdo con Li, F. y Vierstra, R., 2012, la autofagia en levadura, animales y plantas sigue los siguientes pasos:

- a) Inducción:** La inducción es regulada por el estado nutricional de la célula. Bajo condiciones ricas en nutrientes, la proteína TOR (*target of rapamycin*) y otras cinasas inducen la hiperfosforilación de la subunidad ATG13 y la hipofosforilación de la subunidad ATG1, impidiendo así la formación del Complejo ATG1-ATG13. Bajo condiciones de carencia de nutrientes, ambas condiciones son revertidas, permitiendo así que ATG1, ATG13 y las

subunidades accesorias ATG101 y FIP200 se ensamblen. De esta manera el complejo ATG1-ATG13 es activado.

- b) Entrega de membrana:** Se refiere a la expansión del fagóforo, la cual es llevada a cabo por ATG9 que deposita lípidos en el fagóforo en desarrollo. Tal función la realiza en conjunto con las proteínas periféricas ATG2 y ATG18. La membrana del fagóforo se origina de diferentes fuentes que incluyen al Complejo Golgi, endosomas, el Retículo Endoplasmático (RE), la mitocondria y la membrana plasmática (Tooze & Yoshimori, 2010).
- c) Nucleación:** La nucleación del autofagosoma en desarrollo involucra la participación del Complejo I de BECN1 (VPS15-PI3KC3-BECN1-ATG14) que va añadiendo PI3P al fagóforo. Aunque en plantas no se ha reportado aún la existencia de ATG14, se sugiere que otra proteína podría llevar a cabo su función.
- d) Expansión de la vesícula y cierre:** Este paso involucra la decoración del fagóforo con ATG8. La lipidación y anclaje de ATG8 con fosfatidiletanolamida (PE) a la membrana del fagóforo es llevada a cabo a través del complejo ATG12-ATG5/ATG16.
- e) Transporte al lisosoma/ tonoplasto:** El autofagosoma sellado y decorado con ATG8 es transportado a la vacuola con ayuda de proteínas FYCO (que contienen dominios FYVE y CCD) que atan el autofagosoma a la maquinaria de transporte en microtubulos.
- f) Fusión y digestión:** Se refiere a la hemifusión de los autofagosomas con el tonoplasto vía un mecanismo de tipo v-SNARE que libera el cuerpo autofágico al interior de la vacuola. Eventualmente el rompimiento de la membrana de los cuerpos autofágicos libera el cargo en el lumen vacuolar para su posterior degradación a través de las hidrolasas vacuolares.

A la fecha se han encontrado más de 30 genes que participan en los diferentes pasos del proceso de autofagia (genes Atg) (Wang *et al.*, 2011), de los cuales al menos 24 existen en *Arabidopsis* (Bassham *et al.*, 2006). BECN1 participa en la iniciación de la autofagia, de manera particular en el proceso de nucleación, formando el Complejo I con VPS15 y PI3KC3. De este modo, BECN1 regula la generación de PI3P y el subsecuente reclutamiento de proteínas ATG que orquestan la formación del autofagosoma (Wirawan *et al.*, 2012; Xie & Klionsky, 2007). Al menos en animales, se tienen reportes de que BECN1 es el regulador más importante de autofagia (Wang *et al.*, 2011).

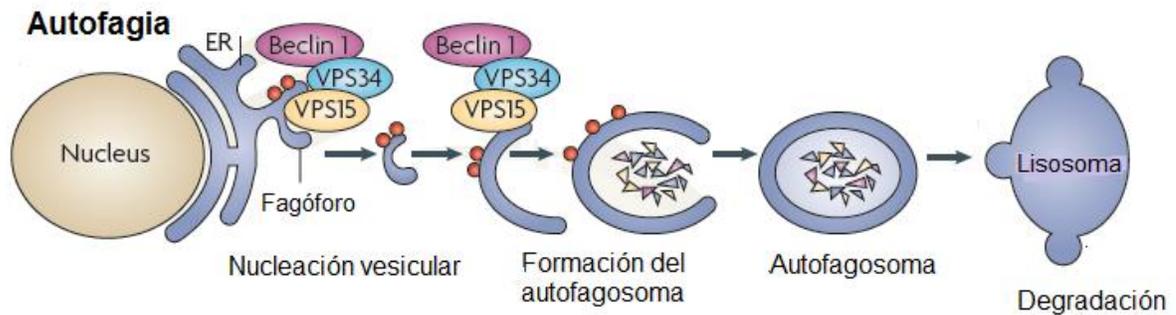


Figura 4. La participación de BECN1 en la autofagia de mamíferos. Durante la autofagia, ocurre la formación de un aislado de membrana llamado fagóforo que se expande en una estructura de doble membrana y secuestra el material citoplasmático formando eventualmente un autofagosoma (Modificado de Vanhaesebroeck *et al.*, 2010).

Reciente a su identificación, se comprobó el papel de BECN1 en autofagia y su función conservada en este proceso, debido a que se reportó que la BECN1 de humano podía restaurar la autofagia en levaduras mutantes en ATG6 (Liang *et al.*, 1999). En *Drosophila*, también se ha visto que VPS15-PI3KC3-BECN1 forman parte de un complejo específico de autofagia (Lindmo & Stenmark, 2006). Asimismo, existen varios reportes donde se ha observado que la interrupción de ortólogos de BECN1 es suficiente para bloquear la autofagia en levadura y diferentes modelos de animales y plantas (Kihara, Kabeya, *et al.*, 2001; Xiao Huan Liang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005; Patel & Dinesh-Kumar, 2008).

El papel de BECN1 en autofagia siempre se ha relacionado a su función en el complejo con VPS15 y PI3KC3, que a su vez, regula la participación de PI3P.

Sin embargo, aún no es muy claro para que es necesario PI3P durante autofagia. Se ha sugerido que puede formar la plataforma para la biogénesis del autofagosoma (Burman & Ktistakis, 2010); y también, que primero ayuda a distinguir el desarrollo del fagóforo de otros compartimentos de endomembranas durante su ensamble y después ofrece un marco de reconocimiento para la maquinaria que fusiona al autofagosoma con el compartimento lítico (F. Li & Vierstra, 2012).

Por otro lado, también se han caracterizado en mamíferos proteínas derivadas de patógenos que se unen a BECN1. Por ejemplo, las proteínas Nef (Negative Regulatory Factor) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) y la proteína M2 de la influenza, interactúan con BECN1 y bloquean la maduración del autofagosoma (Gannagé *et al.*, 2009; Kyei *et al.*, 2009). Estos trabajos sugieren que BECN1 no solo participa en la formación del autofagosoma, sino que además tiene un papel importante en la maduración del mismo durante la respuesta inmune a diferentes patógenos (Kang *et al.*, 2011).

Como puede notarse, BECN1 interviene en varios pasos importantes de la autofagia, desde la formación del autofagosoma e incluso hasta la maduración del mismo. Muchos de esos pasos son mediados por la activación de proteínas específicas de unión a BECN1, incluyendo inductores e inhibidores de autofagia. Por otro lado, el ensamble de los complejos de BECN1 es dependiente de su uso en la célula o tejido. Se piensa que las interacciones BECN1 con otras proteínas son relativamente inestables, transitorias u ocurren solo bajo condiciones específicas. Esto apoya la hipótesis de que BECN1 tiene funciones adicionales a las de autofagia (Kang *et al.*, 2011).

2.3.1.2 Beclina 1 participa en procesos de tráfico vesicular

Desde que se identificaron los complejos I y II en levadura, se empezaron a encontrar genes ortólogos de sus componentes en eucariotas superiores (principalmente en mamífero) y se ha tratado de comprobar si estos complejos están formados por las mismas proteínas y si llevan a cabo las mismas funciones.

En este contexto, aunque se conoce la importancia del papel de BECN1 en autofagia, su putativo papel en otras vías de tráfico vesicular aún es controversial.

Se ha reportado en células de glioblastoma que cuando se inhibe la expresión de BECN1 se interrumpe la autofagia en respuesta a inanición de nutrientes. Sin embargo, otras vías que también son dependientes de PI3KC3 tales como la vía “*post-endocytic sorting*” del receptor del factor de crecimiento epidérmico o el procesamiento proteolítico de procathepsina D en la ruta del “*trans-Golgi network*” a lisosomas, no fueron afectadas. Por tanto, estos resultados van en contra del papel de BECN1 como un adaptador esencial de PI3KC3 en el tráfico vesicular de membranas, y apoyan la hipótesis de que BECN1 funciona principalmente en acoplarse con PI3KC3 durante la vía de autofagia (Zeng, Overmeyer, & Maltese, 2006).

No obstante, también se ha demostrado que BECN1 de *Arabidopsis* podría participar de manera efectiva en eventos de tráfico vesicular. Esto debido a que *AtBECN1* puede restaurar la vía de la Carbopeptidasa Y (CPY) en mutantes de levadura en ATG6 (Fujiki, Yoshimoto, & Ohsumi, 2007). Pese a esta controversia, cada vez existe mayor evidencia en animales y plantas de que BECN1 lleva a cabo otras funciones relacionadas principalmente con diferentes vías de tráfico vesicular.

2.3.2 Beclina 1 y su regulación

Independientemente de que BECN1 participe en autofagia y/o tráfico vesicular, existen muchos reportes que señalan el papel central de BECN1 en múltiples eventos de señalización celular. Ante la importancia de esta proteína en la célula, se sugiere que su regulación debe ser estricta y a múltiples niveles. Hasta ahora, se tiene evidencia de que BECN1 es regulada a nivel transcripcional, modificaciones post-traduccionales e interacciones proteína-proteína (Wirawan *et al.*, 2012).

La regulación de BECN1 ha sido estudiada principalmente en mamíferos, donde cada vez hay más evidencia que sugiere que factores transcripcionales

como NF- κ B y E2F, así como microRNAs están involucrados en la regulación de la expresión de BECN1 en autofagia. Se sabe que p65, un tipo de factores nucleares NF- κ B, se une directamente al promotor de BECN1 y regula su transcripción y traducción conduciendo a la autofagia en células T (Copetti, Bertoli, Dalla, Demarchi, & Schneider, 2009). Asimismo, estudios recientes sugieren que BECN1 podría ser un blanco del factor transcripcional E2F (Kusama *et al.*, 2009). De hecho, E2Fs pueden transactivar directamente el promotor de BECN1; además, cuando E2F 1, 2 o 3 son eliminados, los niveles de ARNm y proteína de BECN1 se reducen significativamente en células U2OS (Wang, Ling, & Lin, 2010). También se ha observado que miARNs como el miR-30a contribuyen a la modulación de la expresión de BECN1 (Zhu *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha visto que entre el extremo 5' y el intrón 2 del gen de BECN1 se encuentra un grupo denso de islas CpG cuya hipermetilación reduce los niveles de expresión del gen en cáncer de seno (Li *et al.*, 2010).

Por otro lado, BECN1 también puede ser regulada post-traduccionalmente por fosforilación y ubiquitinación. Se sabe que BECN1 es un nuevo sustrato de la proteína cinasa asociada a muerte (DAPK, *death associated protein kinase*) que fosforila a BECN1 en la Thr 119 del dominio BH3, promoviendo así su disociación de proteínas Bcl-2-like, lo que induce autofagia bajo estrés oxidativo (Eisenberg-Lerner & Kimchi, 2012; Zalckvar, Berissi, Eisenstein, & Kimchi, 2009). También la fosforilación de Bcl-2 es otro punto de regulación importante, se ha reportado que las cinasas JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase 1*) (Wei, Pattingre, Sinha, Bassik, & Levine, 2008) y ERK (*extracelular signal-regulated kinase*) (Tang *et al.*, 2010) pueden fosforilar a Bcl-2 y promover su subsecuente disociación de BECN1. Por tal motivo, se sugiere que la interacción entre BECN1 y sus inhibidores es dinámica y está sujeta a la regulación por fosforilación de los participantes de esta asociación (Kang *et al.*, 2011).

Asimismo, se ha visto que la ubiquitinación de BECN1 facilita su oligomerización y la activación de PI3KC3, lo cual dispara la formación de autofagosomas. Este tipo de ubiquitinación es controlado por TRAF6 (*tumor*

necrosis factor receptor-associated factor 6) y la enzima A20 que remueve la ubiquitinación (Shi & Kehrl, 2010).

Debido a que BECN1 es una proteína rica en cisteínas y a que las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) son moléculas de señalización importantes que inician autofagia, se ha sugerido también que la estructura y función de BECN1 podría estar regulada por su estado redox (Kang *et al.*, 2011); sin embargo, aún son requeridos más estudios para precisar esta hipótesis.

3. ANTECEDENTES

La actividad de BECN1 ha sido ampliamente estudiada en células animales y en levadura, donde se sabe que juega un papel importante en autofagia y en otras vías de tráfico vesicular de las que se conoce poco. En plantas existe un creciente interés por el estudio de ésta proteína debido a que se ha demostrado que tiene un papel central en procesos como Muerte Celular Programada (PCD), en mecanismos de desarrollo, respuesta a estrés, germinación e infección por patógenos, principalmente. Se especula que la participación de BECN1 en todos estos eventos se debe a su función en autofagia y como proteína de andamiaje en otras vías que involucran tráfico vesicular.

Desde el primer reporte de BECN1 en plantas de Liu, Y., *et al*, 2005, se demostró que se trata de una proteína conservada en la escala evolutiva y que tiene un papel importante en autofagia; ya que la expresión de la BECN1 vegetal podía restaurar la autofagia en mutantes en Atg6 de levadura. Además, en estos trabajos iniciales se demostró que BECN1 tiene un papel muy importante en el desarrollo vegetal. En el análisis fenotípico de líneas mutantes en BECN1 de *Arabidopsis* (*becn1/becn1*) se observó enanismo en las plantas, raíces cortas, un menor número de hojas y más pequeñas, pocas flores y senescencia temprana (Qin *et al.*, 2007) (Fig. 5). Estas anomalías fenotípicas son similares a las encontradas en plantas de *Arabidopsis* silenciadas en BECN1 usando la tecnología de ARN antisentido, donde es posible observar senescencia acelerada en hojas, plantas con retraso en el crecimiento, tallos de la inflorescencia delgados, raíces cortas, hojas pequeñas, pocas flores, silicuas cortas y una tasa de fertilidad baja (26% menos semillas). También se ha visto que BECN1 es esencial durante etapas tempranas de desarrollo, ya que ha sido imposible obtener plantas “knockout” homocigotas de *Arabidopsis* para éste gen (Patel & Dinesh-Kumar, 2008).

Debido a que desde hace más de cuatro décadas la autofagia ha sido asociada con la senescencia foliar, ésta representa un marco fenotípico obligado para estudiar los genes putativos de autofagia en plantas (Matile & Winkenbach,

1971). Por ello, se ha evaluado el papel de BECN1 durante senescencia en plantas de *Nicotiana benthamiana* donde se ha demostrado que en hojas silenciadas en BECN1 la senescencia se encuentra acelerada (Fig. 6) y se induce la expresión del gen *sen1* (AB026439), un marcador de senescencia. Esto sugiere que BECN1 también tiene una función importante en la autofagia en plantas y que juega un papel fundamental en la prevención de la senescencia prematura (Liu *et al.*, 2005; Patel & Dinesh-Kumar, 2008).

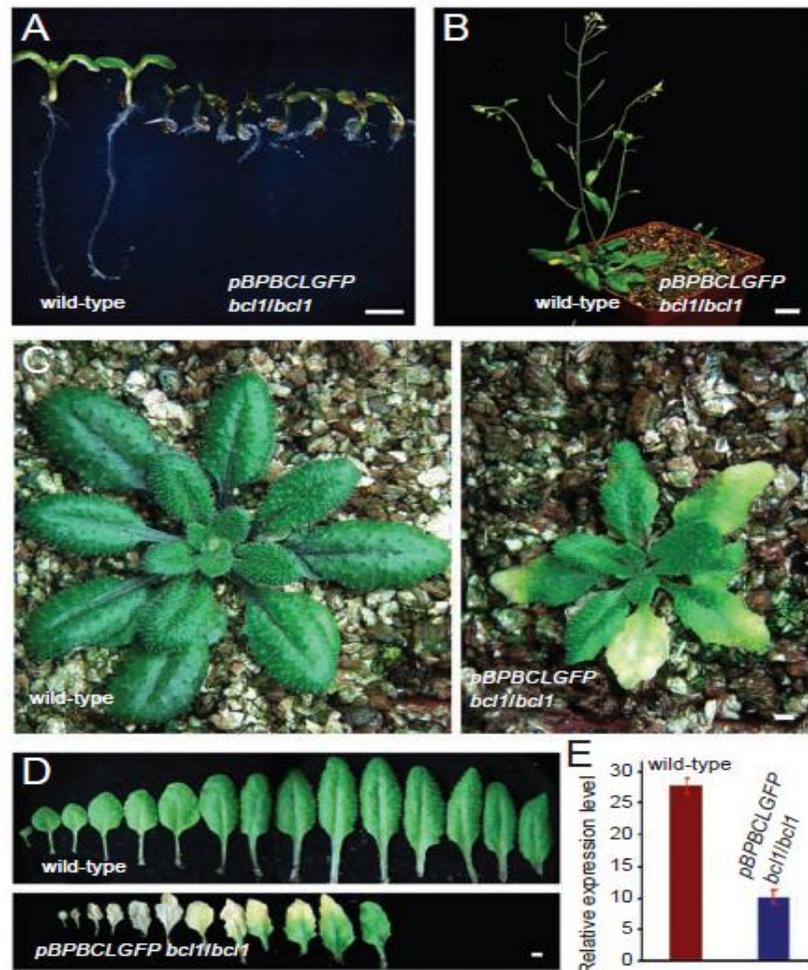


Figura 5. Caracterización de mutantes de *Arabidopsis* en BECN1. a) Plántulas mutantes en BECN1 (*becn1/becn1*) 7 días después de la germinación muestran raíces más cortas comparadas con las silvestres. b) A los 50 días de edad, las plantas mutantes en BECN1 mostraron senescencia foliar temprana, hojas pequeñas, enanismo y pocas flores. c) y d) Las plantas *becn1/becn1* de 30 días de edad mostraron una menor producción foliar y las hojas presentaron senescencia temprana. e) Los niveles de expresión de BECN1 en las plantas *becn1/becn1* fue tres veces más baja que las plantas silvestres (Tomado de Qin *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha reportado que BECN1 tiene un papel importante durante la germinación. En *Arabidopsis*, se ha visto en mutantes insercionales en BECN1 que los granos de polen resultan afectados en la germinación pero no en su maduración, lo que les provoca esterilidad masculina (Fujiki *et al.*, 2007; Harrison-Lowe & Olsen, 2008; Qin *et al.*, 2007) (Fig. 7). Incluso, se ha desarrollado una estrategia para inducir esterilidad masculina a través de la sobre-expresión de AtBECN1 en células del tapetum de tabaco, sistema que se piensa podría tener utilidad en la producción de semillas híbridas (Singh *et al.*, 2010). Debido a que otras mutantes ATG de *Arabidopsis* no presentan este fenotipo y son fértiles, se cree que AtBECN1 interviene en la germinación del polen de manera independiente a autofagia. Esta hipótesis se apoya en que se ha demostrado que esta deficiencia en AtBECN1 afecta a proteínas de transporte vacuolar y al sistema de anclaje del glicosilfosfatidilinositol, lo que también repercute en el desarrollo de la planta (Patel & Dinesh-Kumar, 2008; Qin *et al.*, 2007). Es por ello que se ha propuesto que además de su papel en autofagia, BECN1 participa de manera importante en otras vías de tráfico vesicular en plantas.

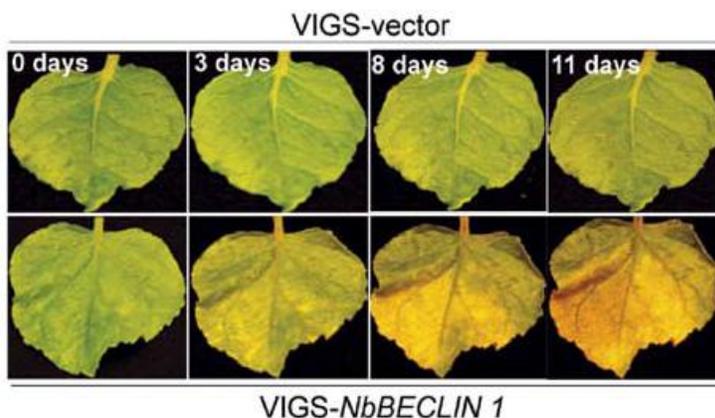


Figura 6. Hojas de *N. benthamiana* silenciadas en BECN1 muestran senescencia acelerada. Hojas sueltas de *N. benthamiana* de plantas silenciadas en BECN1 (abajo) y plantas control (arriba) se sometieron a oscuridad y se fotografiaron a los 0, 3, 8 y 11 días (Tomado de Liu *et al.*, 2005).

En trabajos recientes también se ha demostrado que BECN1 cumple funciones importantes ante diversas condiciones de estrés abiótico. Se ha observado que plantas de *Arabidopsis* que han sido transformadas con un antisentido para el mensajero de *AtBecn1* (*AtATG6-AS*) mostraron mayor sensibilidad a la deficiencia de nutrientes, sufrieron deterioro progresivamente, presentaron clorosis mucho más rápido que las plántulas silvestres y senescencia

acelerada (Fig. 8). Asimismo, a través de tinciones de los autolisosomas con Monodansilcadaverina (MDC) y Liso Tracker (LT), se vio un menor número de éstas vesículas en respuesta a carencia de carbono y nitrógeno en las plantas *AtATG6-AS*; sugiriendo así una disfunción de la autofagia ocasionada por la pérdida de función de BECN1 (Patel & Dinesh-Kumar, 2008).

En este mismo sentido, también se han utilizado las herramientas genómicas disponibles para el estudio de BECN1 en respuesta al estrés en plantas. Se han realizado análisis preliminares empleando los datos públicamente disponibles de microarreglos en *Oriza sativa*, y se ha visto que BECN1 se expresa diferencialmente bajo condiciones de calor, frío y estrés por sequía, indicando que probablemente tiene un papel importante en respuesta a estos tipos de estrés abiótico. Igualmente, mediante estos mismo análisis se ha sugerido que BECN1 responde a la señalización de Ácido Abcísico (ABA) y a estrés salino (Rana, Dong, Ali, Huang, & Zhang, 2012).

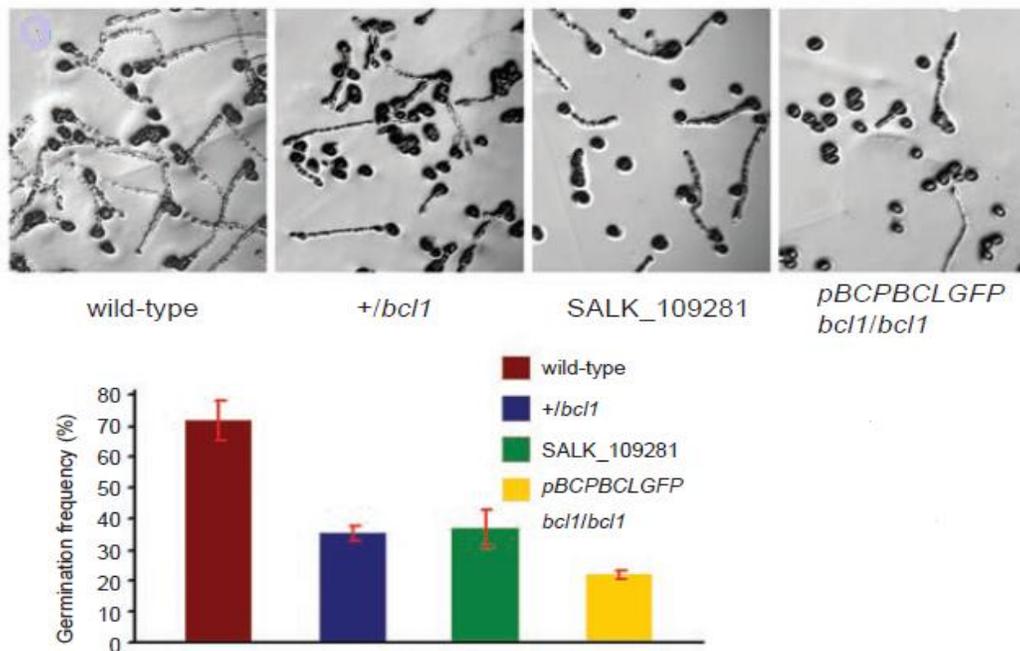


Figura 7. Análisis fenotípico de polen de la mutante insercional de T-DNA en *Becn1*. Germinación *in vitro* de polen silvestre y de diferentes tipos de polen mutantes en *Becn1* (*+/bcl1*, SALK_109281, pBCPBCLGFP *bcl1/bcl1*). En todos los casos de polen mutante, la germinación del tubo polínico se observa afectada (Tomado de Qin *et al.*, 2007).

Por otro lado, también se ha estudiado a BECN1 en las interacciones planta-microorganismo. En este sentido, se ha sugerido en *N. bentamiana* que BECN1 juega un papel importante en restringir los sitios de infección por patógeno (bacterias, hongos y virus) mediante *Muerte Celular Programada* (MCP) por *Respuesta Hipersensible* (RH). La RH es una estrategia de las plantas para resistencia a patógenos, en la cual la rápida inducción de MCP en las células infectadas restringe el crecimiento y la propagación del patógeno a células adyacentes. Sin embargo, en plantas deficientes en BECN1 infectadas con el *Virus del Mosaico del Tabaco*, se vio que en el tejido sano adyacente a la infección y en hojas distales continúa la MCP sin restricción alguna. Asimismo, en estas mismas plantas, los niveles de autofagia se mostraron reducidos, y se observó además que la restricción de MCP requiere de genes como *PI3KC3*, *ATG3* y *ATG7*. De éste modo, en plantas con pérdida de función en BECN1, la Respuesta Inmune Innata por MCP juega un papel patológico más que preventivo. Por lo tanto, en éste trabajo se sugiere que BECN1 y su función en autofagia, juegan un papel importante durante la Respuesta Inmune Innata regulando negativamente la RH por MCP (Liu *et al.*, 2005) (Fig. 9).

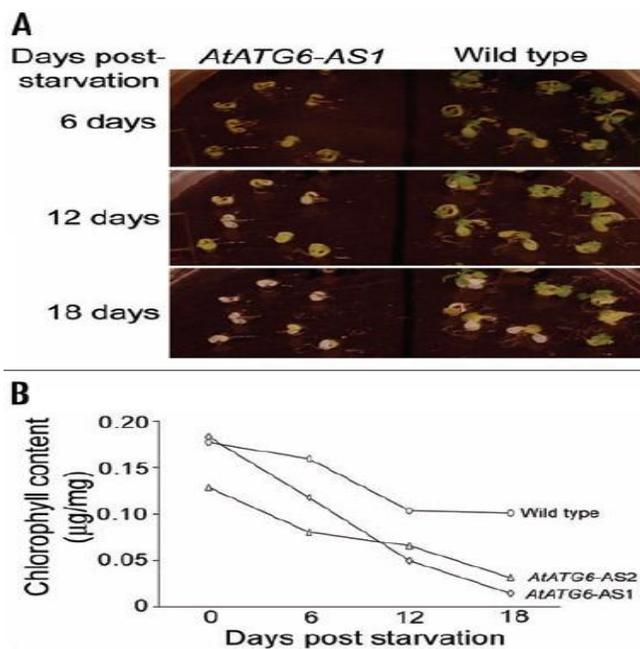


Figura 8. Las plántulas *AtATG6-AS* son sensibles ante deficiencia de nutrientes. a) Plántulas silvestres y silenciadas en BECN1 de 6, 12 y 18 días de edad fueron crecidas en oscuridad a los días indicados después de transferirlas a medio MS sin carbón ni nitrógeno. **b)** Contenido de clorofila ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de plántulas silvestres y silenciadas crecidas en oscuridad a los días indicados después de transferirlas a medio MS sin carbón ni nitrógeno (Tomado de Patel & Dinesh-Kumar, 2008).

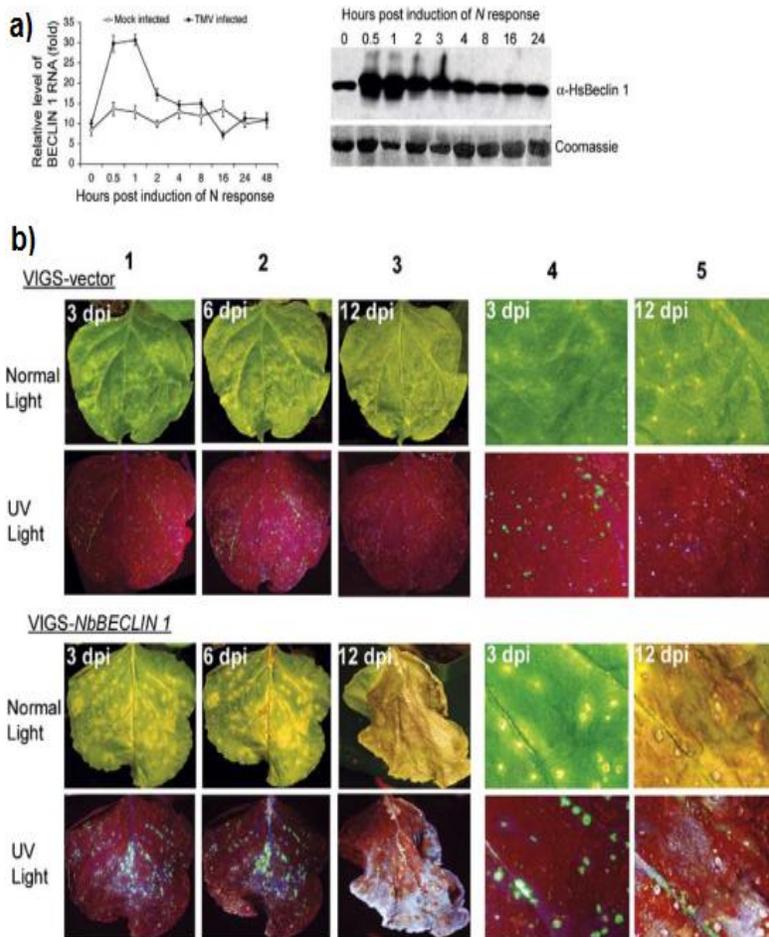


Figura 9. BECN1 es requerida para restringir la expansión de TMV por PCD.

a) Los patrones de expresión de BECN1 están determinados por la HR a la infección por TMV. El análisis de PCR en Tiempo Real de RNA total de hojas infectadas (izquierda) y el ensayo de inmunoblot de proteína total de hojas infectadas (derecha), indican que los niveles de ARNm y proteína de BECN1 incrementan rápidamente en las etapas tempranas de muerte celular por HR ante la inducción de TMV. **b)** La PCD por la inducción de TMV-GFP se evaluó en plantas no silenciadas y silenciadas en BECN1. Las fotografías representativas de hojas control no silenciadas (VIGS-Vector) y silenciadas en BECN1 (VIGS-NbBeclin1) de plantas infectadas con TMV etiquetado con GFP. Estas fotografías muestran como BECN1 es requerida para restringir la muerte celular al sitio de infección en plantas sometidas a HR PCD inducida por infección de patógenos (Tomado de Liu *et al.*, 2005).

Asimismo, la hipótesis de que BECN1 cumple funciones importantes durante la eliminación de patógenos, fue comprobada también en *Arabidopsis* donde se observó que los niveles de ARNm de *AtBecn1* aumentan durante la fase temprana de infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Además, en las plantas de *Arabidopsis* silenciadas en *AtBecn1*, la RH por MCP inducida en el sitio de infección con *P. syringae* no se puede contener y se propaga al tejido no infectado. En conjunto, éstos resultados sugieren la existencia de un mecanismo mediado por autofagia a través del cual algunos patógenos virales y bacterianos han evolucionado a utilizar la maquinaria de autofagia para su supervivencia dentro de la célula huésped (Patel & Dinesh-Kumar, 2008).

4. JUSTIFICACIÓN

En todas las interacciones planta-microorganismo, incluidas tanto las mutualistas como las patogénicas, el tráfico vacuolar es un tema central emergente ya que es requerido para el suministro local de nuevo material de membrana o para la entrega de cargo (proteínas o metabolitos secundarios) al sitio de interacción. Cada vez existe un mayor interés en el estudio de posibles reguladores del tráfico de vacuolar en estas interacciones. Recientemente se ha demostrado en levaduras, mamíferos y plantas que Beclina 1 (BECN1) es una proteína que contribuye de manera significativa en diferentes eventos que requieren de tráfico vesicular, el más estudiado ha sido la autofagia. Por lo tanto, BECN1 podría tener un papel importante en los procesos relacionados con el establecimiento de la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*.

5. HIPÓTESIS

Beclina 1 (BECN1) tiene un papel fundamental durante la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium* ya que forma parte de complejos que regulan la autofagia, la endocitosis y otras vías de tráfico vesicular que participan en la formación y avance del hilo de infección, de los simbiosomas y en la movilización de nutrientes durante la senescencia del nódulo.

6. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

Estudiar la función de Beclina 1 (BECN1) durante la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*.

5.2 *Objetivos específicos*

- a) Identificar y caracterizar el gen de BECN1 en *P. vulgaris* (*PvBECN1*).
- b) Conocer el perfil de expresión de *PvBECN1* durante la simbiosis entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*.
- c) Caracterizar la pérdida de función de *PvBECN1* durante la simbiosis entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*.
- d) Conocer el perfil de expresión de genes involucrados en diferentes vías de tráfico vesicular ante la pérdida de función de *PvBECN1*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Identificación y análisis *in silico* de la secuencia del gen de BECN1 en *P. vulgaris*

Para encontrar la secuencia genómica de BECN1 de *P. vulgaris* (*PvBECN1*), se realizó una búsqueda de homólogos de BECN1 de plantas en la base de datos del “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” y se eligió la secuencia nucleotídica de *Glycine max* (Accession: NM_001251411.1, Gene ID: 351724516). Enseguida se utilizó esta secuencia para realizar un alineamiento contra la secuencia genómica de *P. vulgaris* versión 1.0 reportada en la base de datos de Phytozome v8.0 (www.phytozome.net) (Goodstein *et al.*, 2012), empleando el algoritmo de Basic Local Alignment Tool (BLAST). Una vez identificada *PvBECN1*, se analizó la secuencia putativa del gen a través del programa “Plant Promoter Analysis Navigator (PlantPAN)” (<http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) con el objetivo de identificar algunos elementos *in cis* que pudieran participar en la regulación genética río arriba del gen.

Por otra parte, se analizó la estructura génica de *PvBECN1* mediante Phytozome v8.0 y también a través del programa GeneWise (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/>) perteneciente al “The European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI)”. En el caso de esta última herramienta, se introdujo la secuencia genómica de *PvBECN1* y su correspondiente secuencia de aminoácidos predicha por Phytozome v8.0 para predecir los intrones y exones de dicho gen. Asimismo, se utilizó la secuencia de aminoácidos de *PvBECN1* para realizar un alineamiento múltiple de proteínas con la herramienta “ClustalW 2.0.10” y para analizar algunas características de la proteína que pudieran proporcionar información sobre su función y regulación. Para ello se utilizaron algunas herramientas del servidor Expert Protein Analysis System (ExPASy), entre ellas SignalP 4.0 para predecir péptidos señal y NetPhos 2.0 para predecir posibles sitios de fosforilación.

De igual forma, se decidió establecer la relación filogenética que guarda *PvBECN1* con las *BECN1* de otros organismos. Para poder establecer dicha inferencia, se seleccionaron algunas secuencias proteicas de *BECN1* ya reportadas de organismos pertenecientes a diferentes taxa. El árbol filogenético se construyó usando el programa MEGA5, por la prueba estadística de “Mínima evolución” y el método de “neighbor-joining” (NJ) (Tamura *et al.*, 2011). En éste análisis, se utilizó la prueba filogenética de “Bootstrap”, de la que se realizaron 1000 réplicas. Asimismo, el análisis de la estructura de las diferentes *BECN1* por dominios se realizó a través de la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) (Punta *et al.*, 2012).

6.2 Construcción de un ARN de interferencia (ARNi) para dirigir el silenciamiento de *PvBECN1*

Para reducir la acumulación del transcrito de *PvBECN1* de forma específica, se decidió utilizar la tecnología de ARN de interferencia (ARNi). Para su construcción, se decidió usar el sistema de clonación por recombinación Gateway® de Invitrogen™ que requiere de la clonación de la secuencia nucleotídica de interés que dirigirá el silenciamiento en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO (pENTR Directional TOPO Cloning Kits, Invitrogen™). En este caso, se diseñaron dos construcciones de ARNi, una de ellas dirigida a la región 5´ (*BECN1-ARNi5´*) y la otra a la región 3´ (*BECN1-ARNi3´*) de la secuencia codificante del transcrito de *PvBECN1*. En la elaboración de ambas construcciones moleculares, se seleccionaron fragmentos de *PvBECN1* cuya secuencia era divergente al de otros genes del genoma de *P. vulgaris*. En el caso de *BECN1-ARNi5´*, se utilizó una secuencia de 400pb; mientras que para *BECN1-ARNi3´*, se seleccionó una secuencia de 414pb. Estas secuencias fueron amplificadas por PCR a partir de cADN de raíz de plántulas de *P. vulgaris* (cultivar Negro Jamapa) utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos:

BECN1-ARNi5´

Sentido 5´-CACCATGCAAGGGTCGTCGGTTCATG-3´

Antisentido 5´-CAACCTCTTTATCAAGTTTATCTGAC-3´

BECN1-ARNi3'

Sentido 5'-CACCTGCCAGTATTTCCGACC-3'

Antisentido 5'-ATGCGAAGATACCATTGCTGAA-3'

Una vez realizada la clonación direccional en pENTR™/D-TOPO, las construcciones se transformaron en células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5α. Después de la electroporación (1.6 V), las células se suspendieron en 250 µL de medio SOC (peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 25mM, MgCl₂ 0.1M, MgSO₄ 0.1M y Glucosa 0.2M) y se recuperaron con agitación a 600 rpm durante 1 hr a 37°C. De esta suspensión, se sembraron 100 µL en una caja de Petri con 25 mL de medio LB sólido (peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y agar bacteriológico 1.4%) adicionado con kanamicina como antibiótico de selección (50 µg/mL, Km50) y se incubaron durante 18 hrs a 37°C. De las colonias obtenidas se eligieron 10-20 al azar y se resembraron en 3 mL de medio LB/Km50 líquido para, posteriormente, hacer extracción de DNA plasmídico con el kit GeneJET (Plasmid Miniprep Kit, Fermentas™). La clonación de los productos de interés fue verificada por PCR y por secuenciación.

Los plásmidos obtenidos (pENTR-BECN1-ARNi5' y pENTR-BECN1-ARNi3') fueron recombinados con el vector binario pTDT-DC-RNAi (Valdés-López *et al.*, 2008) para generar las construcciones de silenciamiento BECN1-ARNi5' y BECN1-ARNi3', respectivamente. El vector binario pTDT-DC-RNAi se caracteriza por permitir la expresión del ARNi bajo la regulación del promotor constitutivo 35S. Además, este plásmido expresa *in planta* a la proteína roja fluorescente TdTomato como marcador molecular (Shaner *et al.*, 2004), presentar al intrón WRKY y contiene un gene de resistencia a espectinomicina (Fig. 10). Esta reacción que requiere de una doble recombinación entre el vector de entrada y el vector destino se realizó con la enzima LR Clonasa de Invitrogen™, donde nuevamente se transformaron células de *E. coli* DH5α con dicha recombinación para su replicación y selección. La doble recombinación se comprobó mediante ensayos de PCR utilizando los oligonucleótidos internos del vector WRKY-5-Rv 5'-GCAGAGGAGGAGAAGCTTCTAG-3 y WRKY-3-Fw 5'-

CTTCTCCAACCACAGGAATTCATC-3, junto con los oligonucleótidos específicos para cada construcción arriba mencionados. Se aisló el plásmido de cada una de las construcciones y se comprobó la orientación correcta del inserto al secuenciar con los oligonucleótidos internos del vector.

Una vez comprobadas las construcciones, cada una fue introducida en *Agrobacterium rhizogenes* K599 por electroporación. Esta electrotransformación fue comprobada por ensayos de PCR, y las colonias positivas fueron seleccionadas para su posterior uso en la transformación de frijol (ver “Transformación de *P. vulgaris* mediante *Agrobacterium rhizogenes* K599”). Asimismo se procedió con el plásmido vacío pTDT-DC-RNAi que sirvió como control.

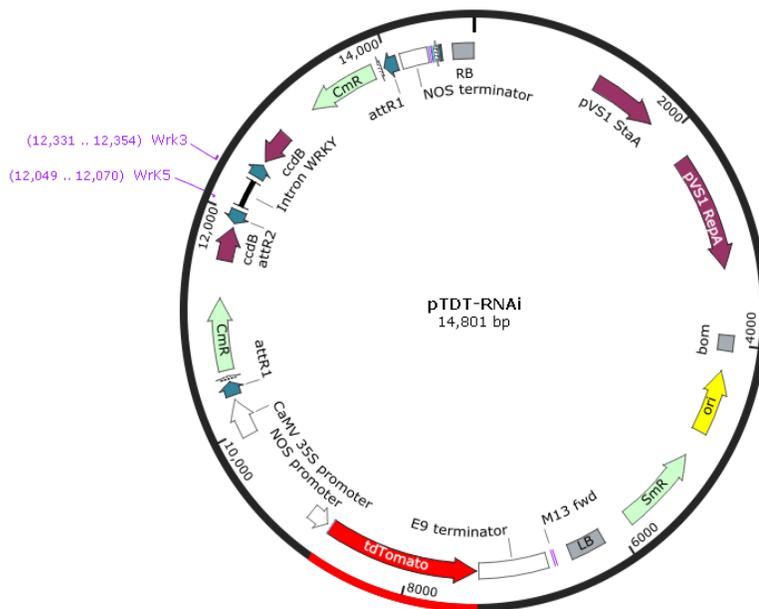


Figura 10. Mapa del vector Gateway pTDT-DC-RNAi. El vector pTDT-DC-RNAi presenta dos sitios de recombinación, uno 5'-5' y otro 5'-3' que permitirán introducir el fragmento del gen a silenciar en cada extremo del intrón WRKY de manera invertida para la formación de una estructura tallo-asa (Valdés-López *et al.*, 2008).

6.3 Cultivo de plantas de *P. vulgaris*

Se germinaron semillas de *P. vulgaris* (cultivar Negro Jamapa) bajo condiciones de esterilidad e incubadas en obscuridad durante 40 - 48 hrs a una temperatura de 26 - 28°C (Fig. 11a y b). Posteriormente, los germinados se montaron en tubos de ensaye estériles con 15mL de medio B&D, un germinado por cada tubo, y se colocaron en gradillas. Las solución B&D consiste de 0.5mL/L

de solución A (2M CaCl₂), 0.5 mL/L de solución B (1M KH₂PO₄ pH 7.0), 0.5 mL/L de solución C (20mM Fe-citrato), 0.5 mL/L de solución D (0.5M MgSO₄, 0.5M K₂SO₄, 2mM MnSO₄, 4mM H₃BO₃, 1mM ZnSO₄, 4mM CuSO₄, 0.2mM CoSO₄) (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). Las plántulas crecieron en condiciones controladas de 26 – 28°C, con periodos de 16hrs de luz y 8 de oscuridad. Para los experimentos donde las plantas debían inocularse con *Rhizobium tropici* CIAT 899, los germinados se colocaron en macetas con vermiculita estéril.

6.4 Transformación de *P. vulgaris* mediante *Agrobacterium rhizogenes* K599

Las cepas de *A. rhizogenes* K599 seleccionadas como positivas por PCR con los plásmidos de silenciamiento pTDT-BECN1-ARNi5' y pTDT-BECN1-ARNi3', se sembraron en una caja petri con medio LB+Sp200 y se incubaron a 30 °C. Después de 24 hrs de crecimiento, el cultivo se colecta con una jeringa estéril de 3mL en un tubo Eppendorff añadiendo 1 mL de agua estéril a la caja petri. Lo mismo se realizó con las cepas control de *A. rhizogenes* K599 sin plásmido y con vector vacío pTDT-DC-RNAi.



Figura 11. Cultivo, transformación e inoculación de *P. vulgaris*. A) Germinación de semillas; b) Germinados después de 48hrs de incubación; c) Transformación de *P. vulgaris* mediante *A. rhizogenes* K599; d) Crecimiento en tubos de ensayo; e) Obtención de callos; f) Obtención de “hairy-roots” (raíces peludas); g) Callos y raíces transgénicas fluorescentes; h) Plantas de *P. vulgaris* inoculadas con *Rhizobium tropici* verde fluorescente CIAT 899.

A los germinados de *P. vulgaris* que fueron sembrados, se les infringió una herida con una aguja hipodérmica en el nodo cotiledonar de acuerdo a lo descrito por Estrada-Navarrete, G., *et al*, 2007 (Fig. 11c). Enseguida, se les agregó sobre la herida \pm 1 a 2 gotas del inoculo de *A. rizhogenes* K599 transformada con cada una de las diferentes construcciones. Después de 7 días de la inyección, las plántulas transformadas empezaron a mostrar callos y ápices de raíz en los sitios de la herida, y 12–15 días después se observaron “hairy–roots” (raíces peludas) (Fig. 11f).

Para determinar si las “hairy–roots” generadas son transgénicas, se observaron en un microscopio estereoscópico de epifluorescencia (Olympus MVX10) para descartar las raíces no fluorescentes (Fig. 11g), esto debido a que el vector de transformación presenta el gen reportero tdTomato. Las plantas con las raíces fluorescentes, fueron colocadas en macetas con vermiculita o en tubos de ensaye con medio B&D para los experimentos posteriores (Fig. 11h).

6.5 Inoculación de las raíces transgénicas con *Rhizobium tropici* CIAT 899

Después de haber obtenido “hairy–roots” de las transformaciones con cada una de las cepas de *A. rizhogenes* K599, se cortó la raíz primaria de cada una de las plántulas y se trasplantaron a macetas de plástico de 15 cm de altura conteniendo vermiculita estéril y se cubrieron con bolsas de plástico perforadas. Las plantas se inocularon con un cultivo fresco de *Rhizobium tropici* CIAT899 que expresa la proteína verde fluorescente (*R. tropici*-GFP) o con un cultivo fresco de *R. tropici* CIAT899 que expresa el gen de la β -glucuronidas (*R. tropici*-GUS) (Vinuesa *et al.*, 2003); en ambos casos el *Rhizobium* se suspendió en MgSO₄ 10mM cuando el cultivo tenía una densidad óptica (DO) de 0.05. Estas plantas fueron regadas cada tercer día posterior a su inoculación con *R. tropici*. Después de 7, 14, 21 y, en algunos casos, 35 dpi (días posteriores a la inoculación con *Rhizobium*) se colectaron muestras de raíces y nódulos para ser observadas por microscopia óptica o confocal y, así, analizar diferentes etapas de la interacción simbiótica entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*.

6.6 Análisis de raíces y nódulos transgénicos de *P. vulgaris* por microscopía óptica y confocal

En el caso de las raíces transgénicas inoculadas con *R. tropici*-GUS se utilizó el microscopio óptico Zeiss Axioskop Uprigth para contabilizar el número total de HI, primordios de nódulo y nódulos en las raíces control y silenciadas en PvBECN1. La tinción de GUS fue realizada de acuerdo a lo propuesto por Jefferson *et al*, 1986, y la clarificación y procesamiento de las muestras fue llevado a caba como se indica a continuación.

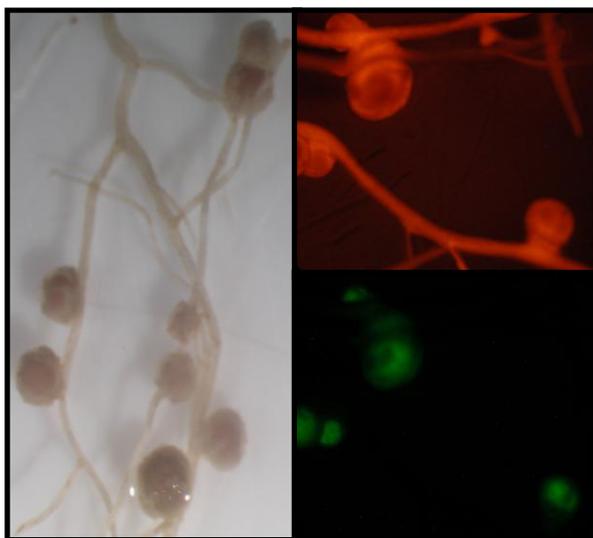
La clarificación de las raíces teñidas con GUS se realizó calentando las muestras a 57 °C en una solución de HCl 0.2M en metanol al 20% durante 15 min. Enseguida las muestras se pasaron a una solución de NaOH 7% en Etanol 60% por 15 min, para luego hacer una serie de tres lavados de 5 min cada uno en Etanol al 40%, 30% y 10%, respectivamente. Posteriormente las muestras se pasaron a una solución de Etanol al 5% en Glicerol al 25% por 15 min, para finalmente guardar las raíces en una solución de Glicerol al 10% en PBS.

Para su análisis, los nódulos fueron seccionados por la parte media y las raíces separadas de la planta para luego ser montadas completas en portaobjetos, a los cuales previamente se les colocó una línea de esmalte de uñas transparente sobre el cual se ubicaron dos tiras de vidrio cortadas de un cubreobjetos, una en cada extremo, formando así una cámara para contener cada fragmento de muestra, al que se le añadió solución de PBS1%-glicerol 50% en relación 1:1. Estas preparaciones de nódulos y de raíces transgénicas con las construcciones de silenciamiento y sus respectivos controles se observaron por microscopía óptica.

Por otro lado, las raíces transgénicas inoculadas con *R. tropici*-GFP fueron analizadas usando microscopia confocal (Fig. 12). Este análisis se llevó a cabo en un Microscopio Confocal Zeiss LSM 510 Meta adaptado a un Zeiss Axiovert 200 M. La excitación de la proteína tdTomato del tejido vegetal transformado se obtuvo a 543 nm utilizando un láser He/Ne y un espejo de excitación dicroico dual HFT UV 488/543/633, con un filtro de emisión LP 560. Mientras que excitación

simultánea de GFP del *Rhizobium* se obtuvo a 488 nm utilizando un láser Ar y un espejo de excitación dicroico dual HFT UV 488/543/633, con un filtro de emisión BP 500-550 IR. Los cortes de nódulos y raíces, así como su montaje en los portaobjetos, se llevó a cabo igual que para las muestras observadas por microscopia confocal.

Figura 12. Raíces y nódulos transgénicos de *P. vulgaris* inoculados con *R. tropici* CIAT GFP. En el panel de la izquierda se muestra una fotografía con luz blanca de nódulos transformados con el vector vacío pTDT-DC (Control). En el panel de la derecha, se muestran los mismos nódulos transformados emitiendo la fluorescencia roja de tdTomato (arriba), e inoculados con *R. tropici* CIAT 899 GFP (abajo). Las fotografías fueron tomadas en el Microscopio de Epifluorescencia Olympus MVX 10.



6.7 Análisis de la expresión genética por RT-qPCR

Se utilizó el reactivo TRIzol de Invitrogen™ para aislar ARN de raíces y nódulos de cada uno de los diferentes experimentos. La integridad del ARN se verificó en un gel de agarosa mediante electroforesis y su concentración se determinó en un NanoDrop (Thermo Scientific 2000c). Antes de realizar el análisis por PCR en Tiempo Real (RT-qPCR), el ADN fue tratado 30 min a 37°C con DNAsa I (1 unit/ µl) de Invitrogen™ para remover el ADN genómico. La DNAsa I se inactivó al incubar las muestras por 10 min a 65°C. Para corroborar la ausencia de ADN genómico en las muestras de ARN, éstas se utilizaron como templado para un ensayo de PCR semi-cuantitativo y el producto del PCR se verificó en un gel de agarosa por electroforesis. Las muestras de ARN libres de contaminación se utilizaron para la síntesis de ADN complementario (ADNc) usando el kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* de Thermo Scientific®, y los ensayos de RT-

qPCR se realizaron con el kit *Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix 2x* de Thermo Scientific®, siguiendo las instrucciones del distribuidor. Las cuantificaciones del RT-qPCR se llevaron a cabo en el equipo *LightCycler® 480 Real-time PCR System* de Roche®. Cada reacción de RT-qPCR se realizó con 150-250 ng de cDNA como templado. Para confirmar la ausencia de ADN genómico en el ensayo, se incluyó una reacción que solo usó ARN como templado. Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos se muestran en la Tabla Suplementaria 1.

Para el caso de la cinética de la expresión de *PvBECN1* durante las etapas tempranas y tardías de la interacción simbiótica, se usó como templado cADN sintetizado a partir de RNA extraído de raíces no inoculadas e inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 colectadas a las 0hrs, 6hrs, 12hrs, 24hrs, 48hrs, 72hrs, 6 días y 8 días para etapas tempranas. Asimismo, para evaluar etapas tardías, se procesaron y colectaron nódulos de 10, 12, 16, 18, 22, 24, 26, 28 y 30 dpi con *R. tropici* CIAT 899. Como control para el análisis de las etapas tempranas se decidió evaluar los niveles de expresión del gen de la nodulina temprana *ENOD40*, ya que se ha reportado que su expresión se incrementa después de la comunicación química inicial entre *Rhizobium* y la planta, promoviendo la primera división de las células corticales de la raíz que darán lugar a la formación del primordio del nódulo (Rohrig, Schmidt, Miklashevichs, Schell, & John, 2002). De igual manera, para analizar las etapas tardías se midió la expresión de la nodulina tardía P41, que es una aspartil-proteasa que se ha sugerido tiene un papel importante en la defensa de la planta durante la interacción simbiótica (Olivares *et al.*, 2011).

Cada muestra fue evaluada por triplicado y los datos fueron normalizados usando como gen de referencia al Factor de Elongación 1- α (PVEF1 α) (Livak & Schmittgen, 2001). La expresión relativa de cada uno de los genes en estudio se calculó con la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct$ del gen de interés menos el Ct del gen de referencia. Para cada par de oligonucleótidos se determinó la presencia de una banda única del tamaño esperado al visualizar el producto de PCR en un gel de agarosa por electroforesis, así como mediante el análisis de la curva de disociación en los ensayos de RT-qPCR.

6.8 Procesamiento y análisis de imágenes

Las imágenes de microscopía confocal y de epifluorescencia se adquirieron con un microscopio LSM 510 Meta (Zeiss) y con una cámara CCD (CoolSNAP HQ2; Photometrics) acoplada a un microscopio invertido Nikon TE300, respectivamente. Las proteínas fluorescentes se excitaron con una lámpara de xenón (330-700 nm) como fuente de iluminación (DG-4; Sutter Instruments). Las imágenes digitales se documentaron con una cámara AxioCam MRCc CCD (Zeiss) y un software de adquisición de imágenes AxioVision. Las imágenes fueron procesadas con el software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA, U.S.A.) e ImageJ (NIH).

7. RESULTADOS

7.1 *Phaseolus vulgaris* tiene un homólogo de BECN1

Se encontró sólo un homólogo de BECN1 en el genoma de *P. vulgaris*, el cual fue nombrado como *PvBECN1*. El marco abierto de lectura de *PvBECN1* (Phytozome Gene ID: Phvul.005G029900) se ubica en el cromosoma 5 y comprende una secuencia nucleotídica de 7,212 pb, constituida por 10 exones y nueve intrones (Fig. 13). La secuencia codificante del gen es de 1,470 pb y la secuencia traducida comprende 489 aa. Según las predicciones del servidor SignalP 4.0 (Petersen, Brunak, von Heijne, & Nielsen, 2011), *PvBECN1* no presenta péptido señal.

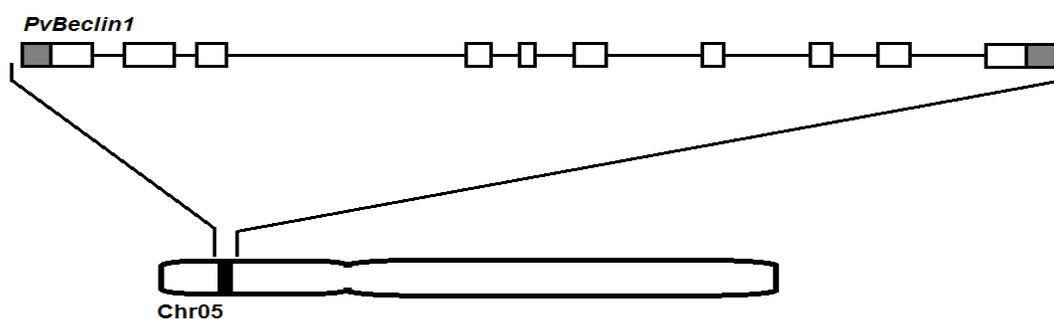


Figura 13. Secuencia genómica de *PvBECN1*. En la parte superior, se muestra la posición que ocupa *PvBECN1* en el cromosoma 5 de *P. vulgaris*. En la parte inferior se muestra un esquema de la secuencia genómica de *PvBECN1* donde los rectángulos en blanco representan los UTR's, los rectángulos en amarillo los exones y las líneas los intrones.

PvBECN1 presenta también una homología significativa con las BECN1 de levadura (*ScBECN1*), humano (*HsBECN1*) y arábidopsis (*AtBECN1*), que han sido reportadas previamente. *PvBECN1* tiene un 24% de identidad y un 42% de similitud con *ScBECN1* (Gene Bank ID: 6325137) (Kametaka, Okano, Ohsumi, & Ohsumi, 1998), un 36% de identidad y un 54% de similitud con *HsBECN1* (Gene Bank ID: AAD27650.1) (Liang *et al.*, 1999), y un 75% de identidad y un 84% de similitud con *AtBECN1* (Gene Bank ID: 825344) (Fujiki *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007) (Fig. 14).

```

Phaseolus_vulgaris/1-489      1 MKKVDN-KGRARTFPVDPNVRWVCCNCRNPICIVGVDSYADKFFNDPSRSGMQGSSVHGASSVLSATK-----
Arabidopsis_thaliana/1-517  1 MRKEE I - PDKSRT IP IDPNLPKWVCCNCHHSLTIVGVDSYAGKFFNDPPSATQGS I HGANSVLGSTR-----
Homo_sapiens/1-450          1 MEGSKTS--NNS-----TMQVSFVCCRC SQPKLDTSFKILD-----
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 1 M-----KCTC HLPQLDPSLEGLS-----LTQRNLLSNNS I I TATNENVISNKG I

Phaseolus_vulgaris/1-489      69 --MDNSYVLLPKQR-PQAQGS AHRPRGDA--AAAQ--PGKAMEESFVV-----VY-KS-----ESG
Arabidopsis_thaliana/1-517  69 --MDNSFVLLPRHKPPQSQGIPPRPRGASSPQPDATQ--SGKAMEESFVV-----VY-KS-----EPV
Homo_sapiens/1-450          36 -----RVT-IQELTAPLLTTA-QA-KPGETQEEETNSGEEFFIETPRQDGVSRRFIPPA-RM-----M-ST
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 48 EAADNCGPQIPKER-LRRLGEIQNIKD-----LNLK--DDKLITDSFVFLNHDDDD-NANITSNSREDQRYGNA-NG

Phaseolus_vulgaris/1-489      119 TDGGGAHSPG-----TGADSGGHLPTHNSGFNSTITVLTRAFETATTCAQVEQPLCLDCMRILS
Arabidopsis_thaliana/1-517  122 SDSGGSHNLS-----LEVQNGPLHSNTSGFNATINVLTRAFDIARTQTQVEQPLCLECMRVLS
Homo_sapiens/1-450          92 ESA-----NSFTLIG-EAS---DGGTMENLSRRLKVTGDLFDIMSGQTDVDPHLEECETDITLL
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 115 NDNKKANS--DTSQGTSTFRDHDEEEQEATDEDENQIQLNSKTLSTQVNAMTNVFNILSSQTNIDFPIQDQCNI I

Phaseolus_vulgaris/1-489      178 DKLDKEVEDVNRDIEAYEACLKRLCEPADVISE-----ADFLKELKLEEEERLQEAIEETKRONAEVNAELKEL
Arabidopsis_thaliana/1-517  181 DKLEKEVEDVTRDVEAYEACVQRLGETQDVLSE-----ADFLKELKLEEEERLVAAIEETEKQNAEVNHQKEL
Homo_sapiens/1-450          146 DQLDQLNVTENECONYKRCLEILEQMEDDS-E-----QLQMLKELALEEERLIQELLEDVYKNRKIYAENLEKV
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 191 NRLKSEYDDAIKERDTYAQFLSKLESQNKIESESNKEKQYSHNLSKENLKKEEERLLDQLLRLEMTDDDLGDELVR I

Phaseolus_vulgaris/1-489      250 ELKSS-----RFKELEDRYWHEFNNFQFQLISYQEERDAI LAKIEVSAHLELLKRTNVLNDAFPISHDGEFGTINNF
Arabidopsis_thaliana/1-517  253 EFKGN-----RFNELEDRYWQEFNNFQFQLIAHQEERDAI LAKIEVSAHLELLNKTNVLI DAFPIRNDGEFGTINNF
Homo_sapiens/1-450          216 QAEAE-----RLDQEEAQYQREYSEFKRQOLELDDLEKSVENQMRYAQTQLDKLKKTNVFNATFHIIWMSGQFGTINNF
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 269 QEKVQLENEK LQKLSQNLMDLNNIQF-----NKNLQSLKQYELSLNQLDKLRKINIFNATFKISHSQPFATINGL

Phaseolus_vulgaris/1-489      323 RLGRLPKIPVEWDEINAAWGQACLLLHTMCQYFRPKFQYRIKIPMGSYPRITDTNNSY-----EL
Arabidopsis_thaliana/1-517  326 RLGRLPKIPVEWDEINAAWGQACLLLHTMCQYFRPKFQCVKIQPMGSYPRIVDSNNETY-----EL
Homo_sapiens/1-450          289 RLGRLPSPVVEWNEINAAWGQVLLHALANKMGLKQ-RYRLVYGNHYSLESLTDKSK-----LPL
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 342 RLGSIPESVVPKIEINAAWGQLI LLLATINKNLKNLV-DYELQPMGSFSKIKKRMVNSVEYNNSTTAPGDWILPV

Phaseolus_vulgaris/1-489      385 F-----GPVNL-FWSTRYDKAMTLFLACLKDFAD-----FAKSKDQENNIPEKCFKLPYK
Arabidopsis_thaliana/1-517  388 F-----GPVNL-FWSTRYDKAMTLYLMCLKDFAD-----FANSKDQENNIIPDNCLNLPYK
Homo_sapiens/1-450          352 YC--SGGLRF-FWDNKF DHAMVAF LDCVQQFKE-----EVEK-----GETRFCLPYR
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 419 YYDENFNLGRIFRKEIKFKDKSLETTLEI I SEITRQLSTIASSYSSQTLTTSQDESMMNNANDVEN---STSILELPYI

Phaseolus_vulgaris/1-489      435 IEND--KV-----ENYSITOSFN-KQENWTKSLKYTL CNLKWALYWFVGNTFNQF--LSAMVSS-----
Arabidopsis_thaliana/1-517  438 IEKD--KV-----LGYSITQSFN-KQESWTKALKYTL CNLKWALYWFVGNTFNQF--LSATVSLPSNISAAGSLYA
Homo_sapiens/1-450          396 MDVEKGI EDTGGSGGSYSIKTQFN-SEEQWTKALKFMLTNLKWLAWVSSQFYN-----
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 494 MNKD--KI-----NGLSVKLGSSPNLEWTTAMKFLITNVKWLAFSSN-LLSKSITLSPTVNYND-----

Phaseolus_vulgaris/1-489      -----H
Arabidopsis_thaliana/1-517  504 KRGPDSKPSCKKT-
Homo_sapiens/1-450          450 -----K-----
Sacharomyces_cerevisiae/1-557 552 -KTI SGN-----

```

Figura 14. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PvBECN1 con las BECN1 de arábidoopsis, humano y levadura. En el alineamiento se muestran sombreados en azul los residuos de aminoácidos conservados, a mayor conservación se muestra el sombreado con mayor intensidad.

7.2 PvBECN1 tiene dos dominios proteicos

Considerando que BECN1 es una proteína conservada en la escala evolutiva y con el objetivo de obtener mayor información de PvBECN1, se construyó un árbol filogenético y se determinaron sus dominios proteicos en función de lo que ha sido reportado para las BECN1 de otras especies. En este análisis se comparó la distribución filogenética de las BECN1 de diferentes especies de las que ha sido secuenciado su genoma. PvBECN1 se agrupó en el subclado de las BECN1 pertenecientes a otras leguminosas, lo cual refleja la cercanía filogenética entre miembros de la misma familia taxonómica (Fig. 15). Es

importante mencionar que durante la búsqueda y análisis de estas secuencias proteicas se encontraron dos BECN1 en *Glycine max* (soya), lo cual era de esperarse debido al evento reciente de duplicación genómica en soya, posterior a la divergencia con *P. vulgaris* (Schmutz *et al.*, 2010). Por lo tanto, esto también sugiere que solo existe una BECN1 en frijol.

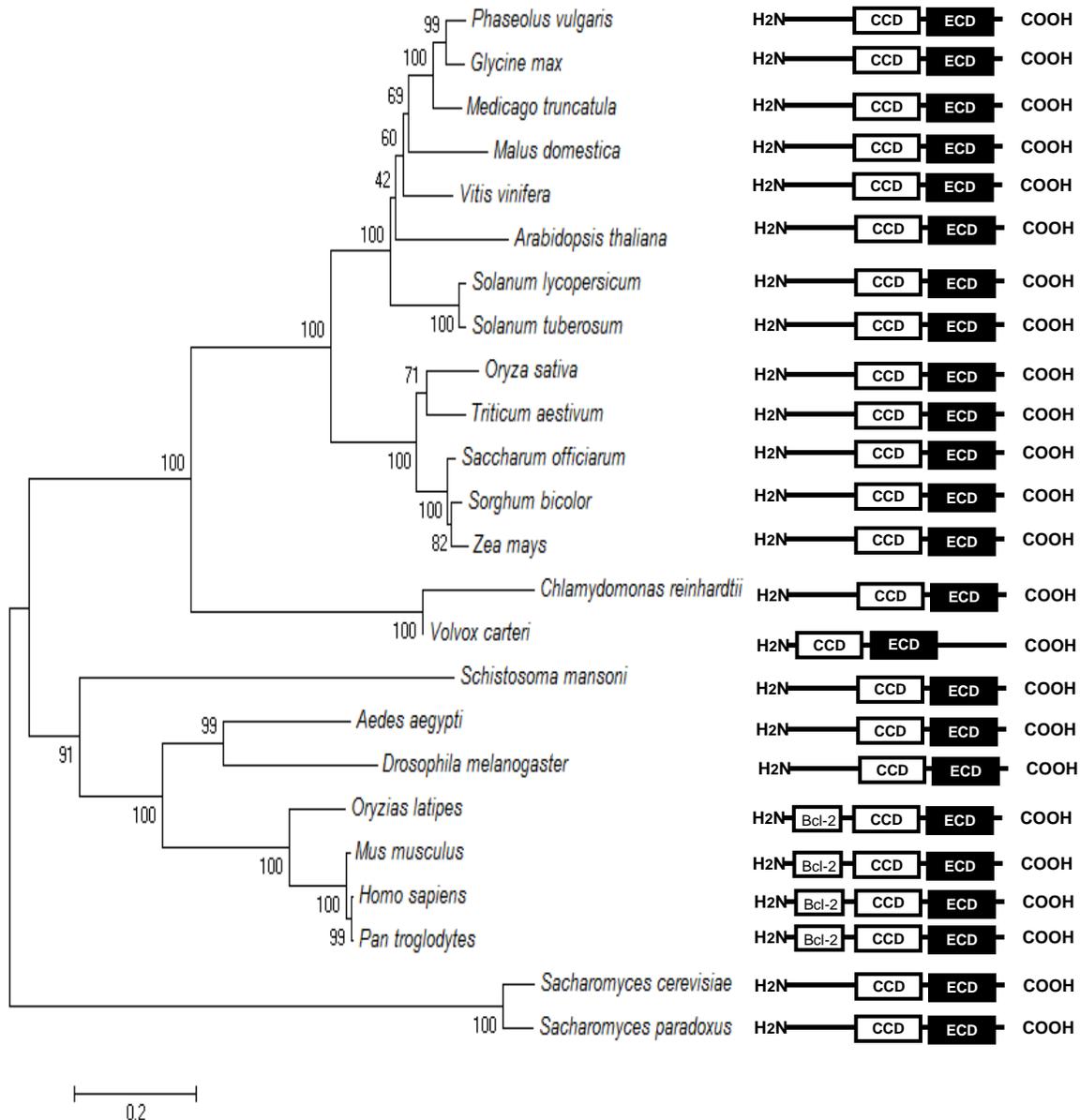


Figura 15. Inferencia filogenética de algunas BECN1 de diferentes organismos y sus respectivos dominios. El árbol filogenético fue generado usando el programa MEGA5 por el método de neighbor-joining. Los valores de Bootstrap están indicados en los nodos y los números de acceso de las secuencias de las BECN1 se encuentran en la Tabla Suplementaria II. A la derecha se muestran los dominios proteicos presentes en cada una de las BECN1 analizadas.

El árbol filogenético construido coincidió con lo reportado por Rana, R.M. *et al.*, 2012 donde las BECN1 de las diferentes especies se aglomeran en tres distintos grupos: GI (plantas monocotiledóneas), GII (plantas dicotiledóneas) y GIII (animales); sin embargo, hubo otras BECN1 que se congregaron en nuevos grupos. Por otro lado, se determinaron los dominios proteicos de las BECN1 analizadas usando la base de datos de Pfam (Punta *et al.*, 2012) y se encontró que PvBECN1, al igual que todas las BECN1 de origen vegetal, presentan solo dos de los tres dominios reportados para las BECN1 de mamíferos (Cao & Klionsky, 2007) (Fig. 15).

7.3 La abundancia de transcrito de *PvBECN1* varía en respuesta a la inoculación con *Rhizobium* y durante la ontogenia del nódulo

Debido a que la raíz de frijol está formada por diferentes tejidos, cada uno compuesto de diferentes tipos de células, se midieron los niveles de transcripción de *PvBECN1* en el ápice, pelos radiculares y raíces rasuradas para evaluar si este gen se expresa en todos los tejidos de la raíz o sólo en un tipo particular de célula. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tejidos/células, demostrándose así que *PvBECN1* se expresa de manera similar en la raíz (Fig. 16). Estos ensayos se realizaron mediante RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen (ver Tabla Suplementaria I). De acuerdo con el atlas de expresión génica de *P. vulgaris* basado en datos de RNA-Seq (O'Rourke *et al.*, 2014), *PvBECN1* se expresa diferencialmente en la planta completa. Estos datos muestran que *PvBECN1* presenta los niveles más altos de expresión en hojas, raíces y nódulos deficientes en la fijación de nitrógeno de 21dpi (Figura Suplementaria I).

Por otro lado, con el objetivo de definir el perfil de acumulación de los transcritos de *PvBECN1* durante la simbiosis entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*, se decidió evaluar mediante un ensayo de RT-qPCR muestras de raíces inoculadas y no inoculadas que se encontraban en etapas tempranas y tardías de la interacción. Como se observa en la Fig. 17a, poco después de la inoculación con

R. tropici CIAT 899, la acumulación del transcrito de *PvBECN1* se incrementó comparado con las raíces no inoculadas (control) presentando el aumento más alto a las 6hrs, donde la abundancia del ARNm de *PvBECN1* es hasta dos veces más que en las raíces control. No obstante, después de este pico de expresión los niveles del transcrito disminuyen y se mantienen hasta los 8 días después de la inoculación. En general, *PvBECN1* presenta una expresión relativa baja con respecto a *ENOD40* (Fig. 17b), cuya participación es importante en ésta etapa de la simbiosis (Rohrig *et al.*, 2002).

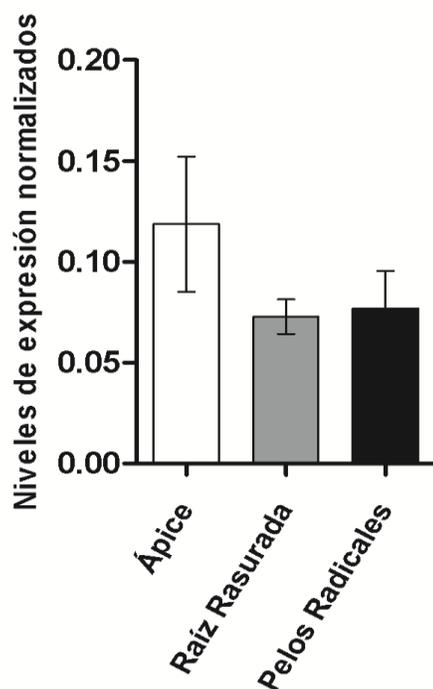


Figura 16. Perfil de expresión de *PvBECN1* en Ápice, Raíz Rasurada y Pelos Radicales de raíces de dos días de crecimiento de *P. vulgaris*. La acumulación de transcrito *PvBECN1* en raíces transgénicas fue determinado por ensayos de RT-PCR a partir de cADN de germinados de *P. vulgaris* de dos días de crecimiento. Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia *EF1 α* . La significancia estadística fue determinada usando la prueba *t*-Student. Las barras representan \pm SEM (de las siglas standard error of the mean) de al menos dos replicas biológicas con tres réplicas técnicas, n=150.

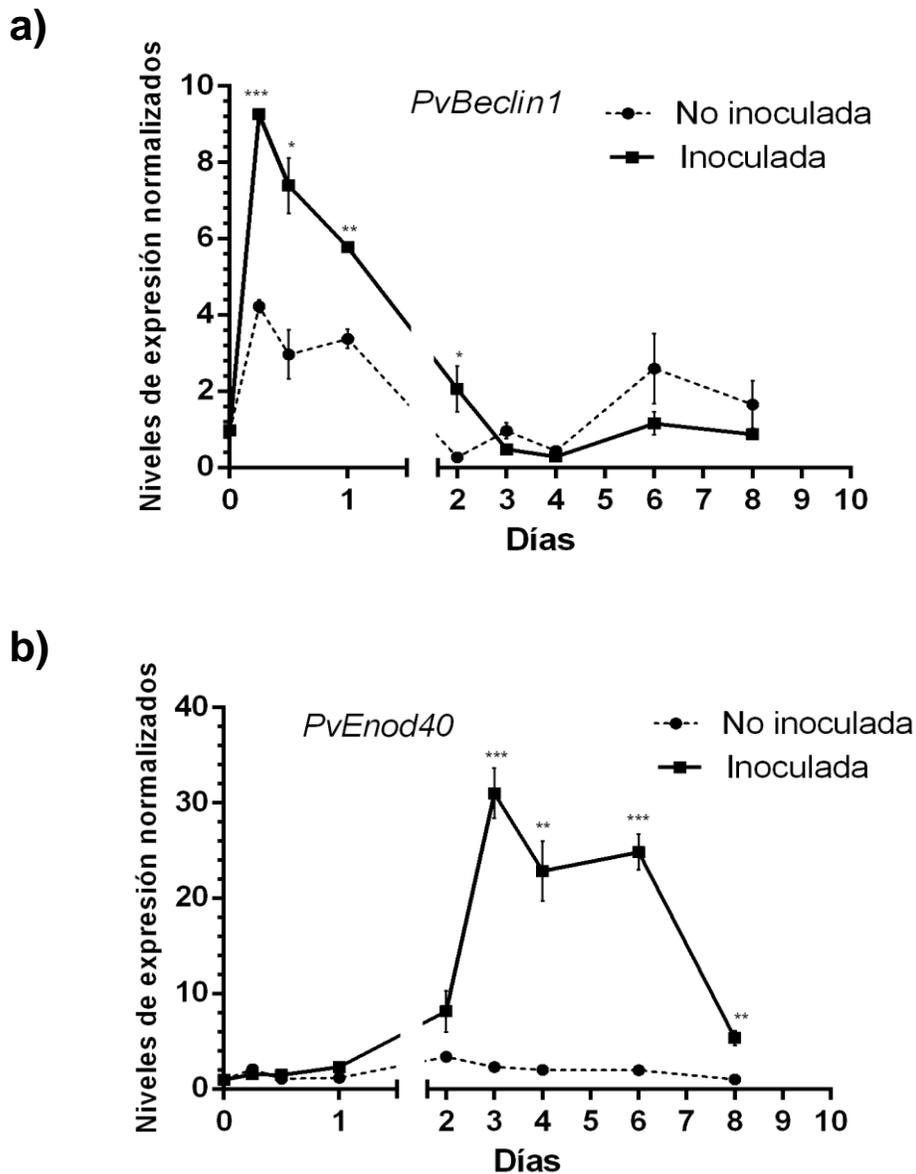


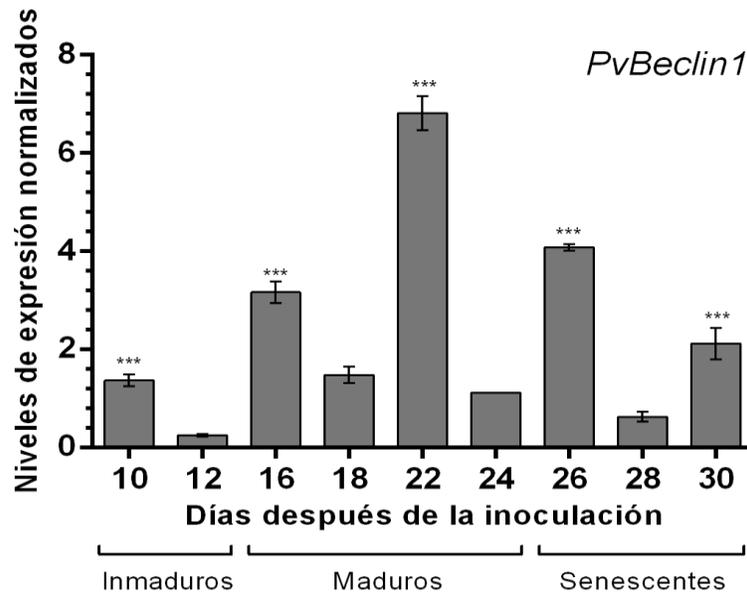
Figura 17. Perfil de expresión de *PvBECN1* y *PvENOD40* en etapas tempranas de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*. En a) se muestra el perfil de expresión de *PvBECN1*, y en b) el perfil de expresión de *PvENOD40* de raíces no inoculadas e inoculadas con *R. tropici* CIAT899. Para cada gen, el patrón de expresión se determinó por RT-qPCR utilizando cADN de raíces. Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia *EF1α*. La significancia estadística fue determinada usando la prueba *t*-Student comparando con el control (*, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Las barras representan \pm SEM (de las siglas stándard error of the mean) de al menos dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas, $n=10$.

De igual manera, se decidió medir los niveles de transcrito de *PvBECN1* durante la ontogenia del nódulo para conocer su perfil de expresión durante etapas tardías de la simbiosis. Estos datos revelaron que donde existe una mayor acumulación de transcrito de *PvBECN1* es en nódulos maduros de 22 dpi. Mientras que, en primordios de nódulo, la abundancia de *PvBECN1* es la más baja comparada con los nódulos maduros y senescentes (Fig. 18a). Estos resultados fueron respaldados por el análisis de la acumulación de transcrito de la nodulina tardía *PvP41*, que presenta un patrón de expresión tardío elevado durante el desarrollo del nódulo (Olivares *et al.*, 2011) (Fig. 18b).

7.4 La pérdida de función de *PvBECN1* perjudica la progresión del hilo de infección (HI) en raíces de *P. vulgaris*

Como se mostró en los análisis de la expresión génica de *PvBECN1*, este gen se expresa en la raíz y en pelos radicales de *P. vulgaris*, donde se inicia la relación simbiótica con *Rhizobium*. Asimismo, *PvBECN1* parece tener un papel importante durante etapas tempranas y tardías de esta interacción por presentar picos de expresión a estos tiempos. Para definir su posible papel en la simbiosis, se realizó la pérdida de función de *PvBECN1* en raíces transgénicas de plantas compuestas de *P. vulgaris* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007) mediante la tecnología de ARNi. Se decidió elaborar dos construcciones de silenciamiento, una dirigida hacia el extremo 5' del transcrito (400pb) y otra hacia la región 3' (414pb), esto con el objetivo de asegurar el posible efecto del silenciamiento solo a *PvBECN1* (Figura Suplementaria II y III). En primer lugar, para revisar la eficiencia y especificidad de las construcciones diseñadas, se midió la acumulación de transcrito de *PvBECN1* en raíces silenciadas de 14 días para ambas construcciones de ARNi (5' y 3'). Como se muestra en la Fig. 19, los niveles de ARNm se redujeron hasta un $78.68 \pm 2.74\%$ comparado con las raíces control. Estas raíces silenciadas fueron las que se utilizaron para evaluar la pérdida de función de *PvBECN1* en los diferentes ensayos de nodulación.

a)



b)

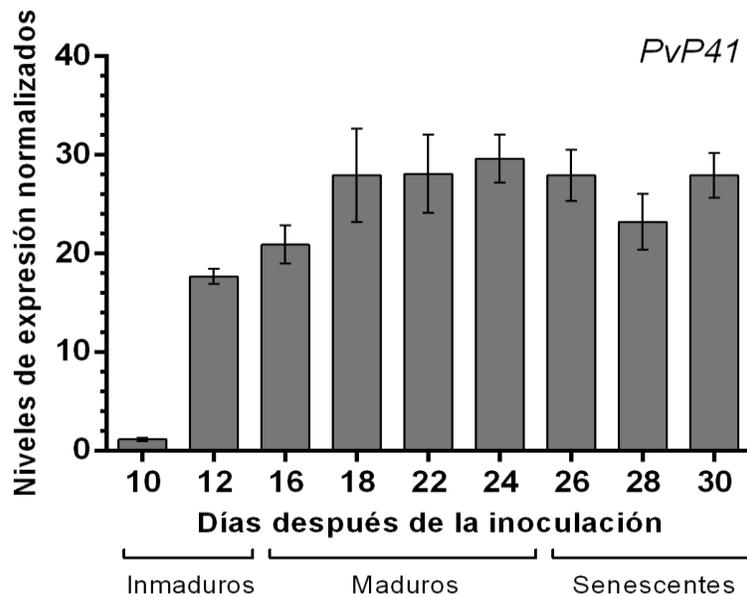


Figura 18. Perfil de expresión de *PvBECN1* y *Pvp41* durante la ontogenia del nódulo simbiótico. En a) se muestra el perfil de expresión de *PvBECN1*, y en b) el perfil de expresión de *Pvp41* en nódulos de 10, 12, 16, 18, 22, 24, 26, 28 y 30 dpi con *R. tropici* CIAT899 (*Inmaduros*, primordios y nódulos jóvenes; *Maduros*, nódulos que fijan nitrógeno; *Senescentes*, nódulos que cesaron la fijación de nitrógeno). Para cada gen, el patrón de expresión se determinó por RT-qPCR utilizando cADN de raíces. Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia *EF1α*. La significancia estadística fue determinada usando la prueba *t-Student* comparando con el control (*, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Las barras representan \pm SEM (de las siglas standard error of the mean) de al menos dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas, $n=10$.

Una vez verificada la eficiencia y especificidad de las diferentes construcciones, se evaluó el efecto de dicho silenciamiento en la simbiosis *P. vulgaris-Rizobia* mediante ensayos de nodulación a diferentes tiempos después de la inoculación con *Rhizobium*. Las raíces transgénicas de 7 y 14 dpi con *Rhizobium* mostraron un desarrollo normal. Incluso, las raíces control (sin vector y con vector vacío) presentaron primordios de nódulos y nódulos jóvenes; mientras que las raíces con pérdida de función en *PvBECN1* no los presentaron. En el análisis de Microscopía Confocal de estas raíces silenciadas, se encontraron eventos de infección con HI que no progresaban hacia las células corticales y que se quedaban arrestados en la epidermis de la raíz, lo cual no coincidió con lo observado en las condiciones control (Fig. 20).

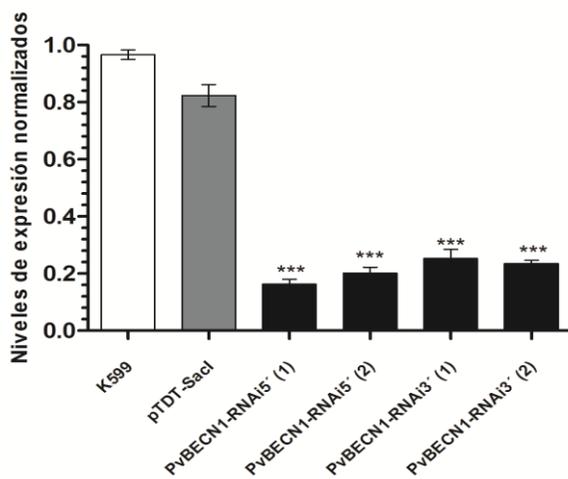


Figura 19. Nivel de silenciamiento para cada construcción en diferentes plantas. La acumulación de transcrito de *PvBECN1* en raíces transgénicas fue determinado por ensayos de RT-PCR en las raíces control y en las raíces con pérdida de función de 14 días post-emergencia. Los resultados que se muestran pertenecen a raíces de plantas independientes. Los números en paréntesis indican las plantas usadas en éste estudio. Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia *EF1α*. La significancia estadística fue determinada usando la prueba *t-Student* comparando con el control (*, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Las barras representan \pm SEM (de las siglas standard error of the mean) de al menos dos replicas biológicas con tres réplicas técnicas, $n=10$.

Asimismo, el análisis de estas raíces a los 7 y 14 dpi pero inoculadas con *R. tropici*-GUS y mediante microscopía óptica, reveló los mismos resultados. Sin embargo, fue posible observar en los eventos de infección arrestados de las raíces con pérdida de función en *PvBECN1*, que en algunos casos las células corticales mostraron división celular y otras veces no (Fig. 21). Por otro lado, en estas mismas raíces se encontraron pelos radicales deformes u atrofiados, los cuales no estaban presentes en las raíces de las condiciones control (Fig. 22). Esto podría sugerir que la ausencia de *PvBECN1* podría estar afectando además la división de las células del córtex y el mantenimiento de la integridad de los pelos radicales.

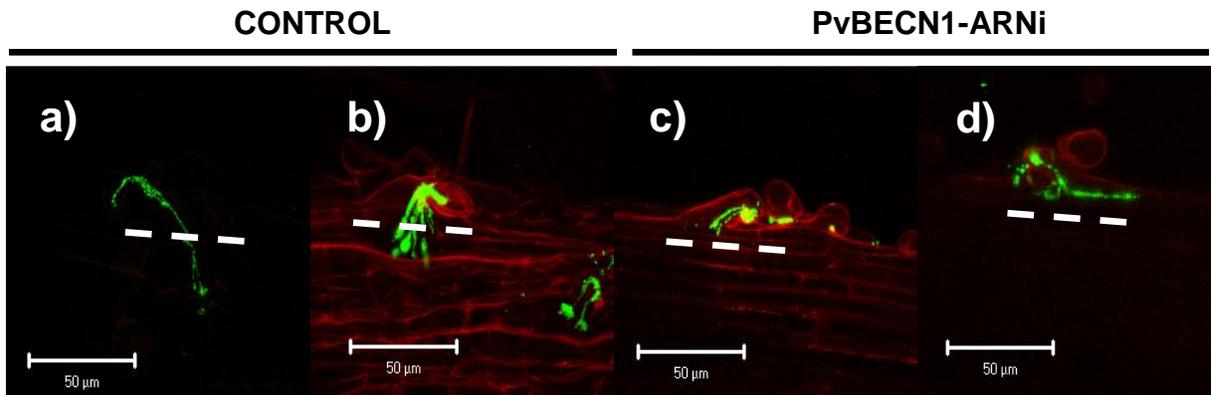


Figura 20. Efecto de la pérdida de función de PvBECN1 al inicio de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*. En todos los casos se observan eventos tempranos de invasión de *R. tropici* CIAT 899-GFP (en verde) a las raíces de *P. vulgaris* (en b, c y d se observan en rojo por la expresión de la proteína tdTomato). En a) y en b) se observan eventos de infección exitosos pertenecientes a las raíces control generadas con *A. rhizógenes* K599 vacía y transformada con vector vacío (VV), respectivamente. En c) y en d) se observan eventos de infección arrestados de las raíces transformadas con BECN1-ARNi3' y BECN1-ARNi5', respectivamente. Las imágenes se adquirieron de raíces transgénicas de 14 dpi con *Rhizobium* por microscopía confocal. Las líneas punteadas indican la base del pelo radical.

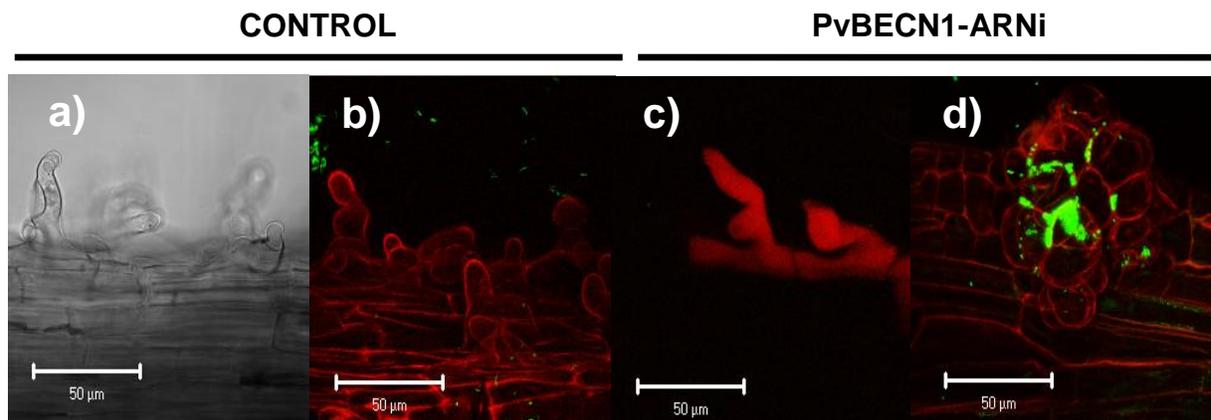


Figura 22. Efecto de la pérdida de función de PvBECN1 en pelos radicales de *P. vulgaris*. En todos los casos se observan pelos radicales después de la invasión de *R. tropici* CIAT 899-GFP (en verde) a las raíces de *P. vulgaris* (en b, c y d se observan en rojo por la expresión de la proteína tdTomato). En a) y en b) se observan pelos radicales de las raíces control generadas con *A. rhizógenes* K599 vacía y transformada con vector vacío (VV), respectivamente. En c) y en d) se observan pelos radicales de las raíces transformadas con BECN1-ARNi3'. En c) se muestran pelos radicales individuales y en d) un grupo de pelos radicales. Las imágenes se adquirieron de raíces transgénicas de 14 dpi con *Rhizobium* por microscopía confocal.

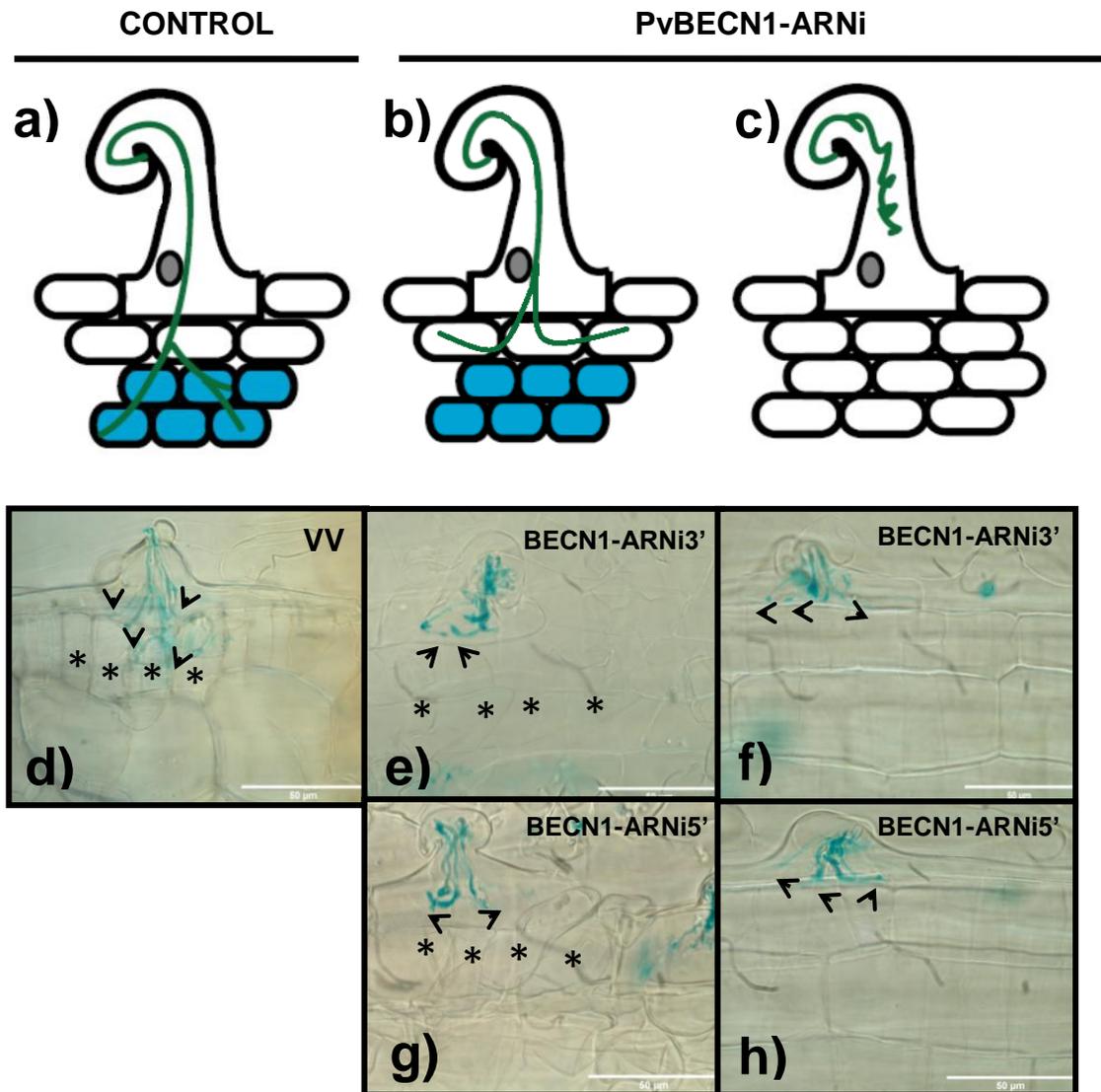


Figura 21. Efecto de la pérdida de función de PvBECN1 en las células del córtex de la raíz de *P. vulgaris*. En la parte superior (a, b, c) se observan esquemas de los tres tipos de eventos de infección de *Rhizobium* encontrados en el análisis fenotípico de la pérdida de función de *PvBECN1* (Esquemas modificados de Perrine-Walker, Lartaud, Kouchi, & Ridge, 2014). En cada caso se muestran fotografías de los ejemplos ilustrados. En d) se observa un evento de infección exitoso, con células del córtex externo en división. Estos eventos se encontraron principalmente en las condiciones control (VV, vector vacío). En e, f, g y h se observan eventos de infección arrestados, algunos presentan división de las células del córtex externo (e y g), y otros no presentaron dicha división (f y h). Estos eventos se encontraron principalmente en las raíces con pérdida de función en *PvBECN1* (BECN1-ARNi3' y BECN1-ARNi5'). Las imágenes se adquirieron de raíces transgénicas clarificadas de 14 dpi con *R. tropici*-GUS analizadas por microscopía óptica. Las flechas indican la dirección que siguen los hilos de infección, y los asteriscos indican las células del córtex externo que se encuentran en división.

Es importante resaltar el efecto observado en la división mitótica en las células del córtex externo, el cual es un proceso muy importante en el inicio del desarrollo del primordio de nódulo en las leguminosas que presentan nódulos determinados como *P. vulgaris*. El pico de acumulación de transcrito observado a las primeras horas de la interacción simbiótica (Fig. 17) y estos defectos en el programa de desarrollo del nódulo debidos a la reducción del ARN mensajero de *PvBECN1*, podrían explicar la importancia de este gen durante las etapas tempranas de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*.

7.5 La pérdida de función de *PvBECN1* reduce el número de primordios y nódulos

Debido a lo observado en etapas tempranas de la interacción simbiótica donde se mostró que *PvBECN1* parece tener un papel fundamental en el establecimiento del *Rhizobium* en el córtex de la raíz, se decidió analizar entonces las etapas tardías de este proceso. Para ello, se contabilizó el número total de primordios de nódulo y nódulos en dos diferentes ventanas de tiempo, a 14 y 21 dpi. En ambos casos, las plantas compuestas de *P. vulgaris* mostraron un desarrollo normal y se eligieron a las más robustas para el análisis. De acuerdo con lo observado, hubo una disminución significativa en el número de primordios de nódulo y nódulos en las raíces silenciadas comparadas con las raíces control (Fig. 23). Como era de esperarse de acuerdo con la ontogenia del nódulo, hubo un mayor número de nódulos y primordios a 21 dpi comparado con 14 dpi en las raíces control. Sin embargo, en las raíces silenciadas este incremento fue mínimo (Tabla 1). El análisis de los pocos primordios de nódulo y de los nódulos que se formaron en las raíces con pérdida de función, mostró que la mayoría de estas estructuras no contenían bacterias al interior y por lo tanto no eran funcionales; lo cual no ocurrió en las condiciones control (Fig. 24). Este resultado continúa demostrando que *PvBECN1* es una proteína fundamental en el éxito de la colonización de la raíz de *P. vulgaris* por *Rhizobium* durante el proceso simbiótico.

Tabla 1. Número de nódulos y primordios de nódulos en raíces con pérdida de función en *PvBECN1*

Raíces	14 dpi		21 dpi	
	Primordios	Nódulos	Primordios	Nódulos
Control (SV)	87.8 ± 14.7	184.8 ± 9.4	126.3 ± 15.1	239.3 ± 34.2
Control (VV)	101.7 ± 6.3	232.0 ± 31.8	145.7 ± 14.2	275.0 ± 18.4
BECN1-ARNi3'	4.5 ± 3.0***	12.2 ± 6.9***	12.3 ± 5.2***	13.3 ± 9.4***
BECN1-ARNi5'	7.6 ± 7.1***	7.3 ± 6.3**	12.6 ± 3.2***	11.2 ± 3.9***

Este ensayo de nodulación se realizó en raíces transgénicas cosechadas a los 14 y 21 dpi. ** y *** valor de P < 0.01 y 0.001 respectivamente. La prueba de *t-Student*, se hizo en comparación con las condiciones control (SV, sin vector; VV, vector vacío).

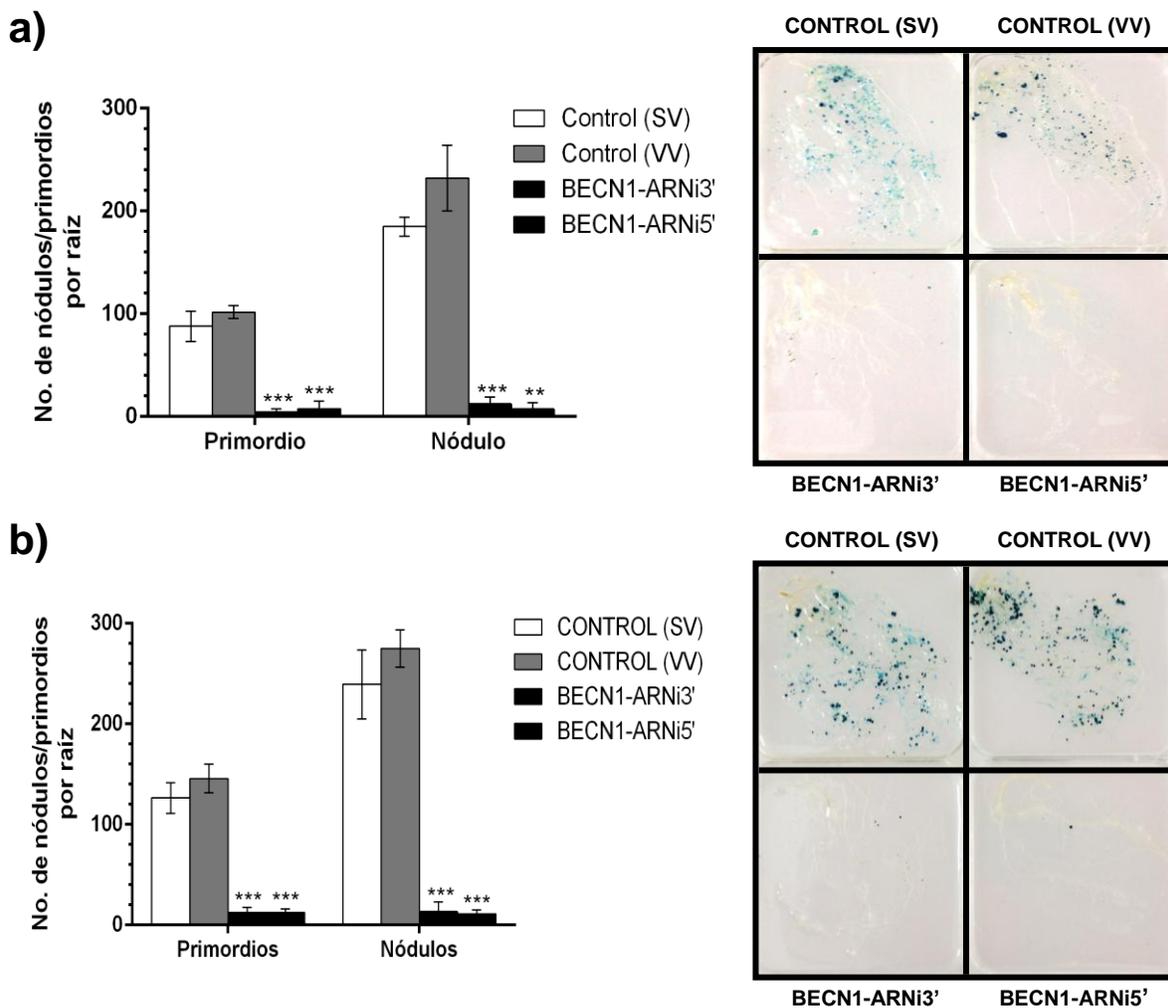


Figura 23. Análisis de la infección de *Rhizobium* en las raíces silenciadas en *PvBECN1*. En a y b, a la izquierda, se muestra el número de nódulos/ primordios por raíz a 14dpi y 21 dpi respectivamente. En ambos casos, a la derecha, se muestran fotografías de raíces clarificadas que fueron colonizadas por *R. tropici*-GUS para cada condición, los puntos azules son nódulos o primordios. Las barras representan \pm SEM (de las siglas stándard error of the mean) de al menos tres réplicas técnicas. El análisis estadístico por *t-Student* mostró diferencias significativas entre los controles y las plantas silenciadas, n=12.

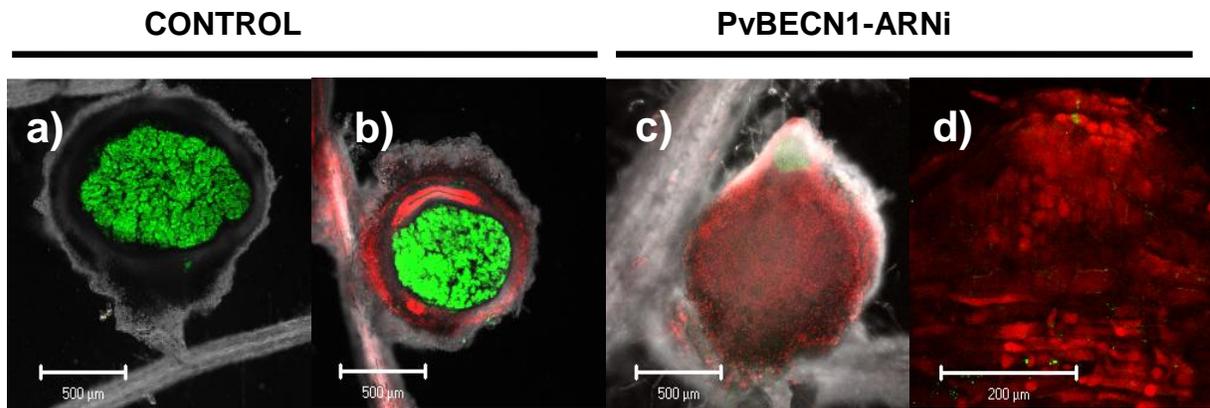


Figura 24. Efecto de la pérdida de función de PvBECN1 en nódulos y primordios. En todos los casos se observan nódulos/ primordios generados 21 dpi después de la invasión de *R. tropici* CIAT 899-GFP (en verde) a las raíces de *P. vulgaris* (en b, c y d se observan en rojo por la expresión de la proteína tdTomato). En a) y en b) se observan nódulos con bacterias en su interior originados de las raíces control generadas con *A. rhizogenes* K599 vacía y transformada con vector vacío (VV), respectivamente. En c) se observa un nódulo vacío y el d) un primordio vacío originado de las raíces transformadas con BECN1-ARNi3'. Las imágenes se adquirieron de raíces transgénicas de 21 dpi con *Rhizobium* por microscopía confocal.

7.6 La pérdida de función de *PvBECN1* cambia los niveles de expresión genes involucrados en autofagia y otras vías de tráfico vesicular

De lo que se ha estudiado hasta ahora en animales y levadura, se sabe que BECN1 forma principalmente dos complejos multiproteicos en los que participa junto a VPS15 y PI3KC3; los cuales se encuentran altamente conservados entre los eucariontes (Wirawan *et al.*, 2012). Estos complejos determinan la función de BECN1 en autofagia y otros procesos de tráfico vesicular diferentes de autofagia (Kim *et al.*, 2013). Con el objetivo de determinar si las funciones de PvBECN1 durante las etapas tempranas de la simbiosis pudieran estar comprometidas a los componentes de estos complejos, se midió la acumulación de transcrito de homólogos en *P. vulgaris* de los genes del complejo y de algunos participantes comunes de autofagia y de otras vías de tráfico vesicular en raíces con pérdida de función en *PvBECN1*. Estos resultados mostraron que el silenciamiento de *PvBECN1* disminuye la abundancia de transcrito de los genes cuyas proteínas participan formando el núcleo del Complejo BECN1-PI3KC3, como *PvPI3K* que muestran una disminución de hasta un 40%. Asimismo, los niveles de genes de autofagia como *PvATG8f* y *PvATG9* también muestran una disminución aparente

de hasta el 12% y 30%, respectivamente. Con respecto a los genes que se han adjudicado principalmente en funciones de transporte vesicular, se observó que *PvUVRAG* también disminuye hasta un 49%; lo cual no sucede con el gen *PvRab5b* que parece inducirse hasta un 80% ante ésta condición (Fig. 25). El gen homólogo de *PvRab5b* en animales tiene un papel fundamental en el transporte vesicular de membranas (Ezougou *et al.*, 2014).

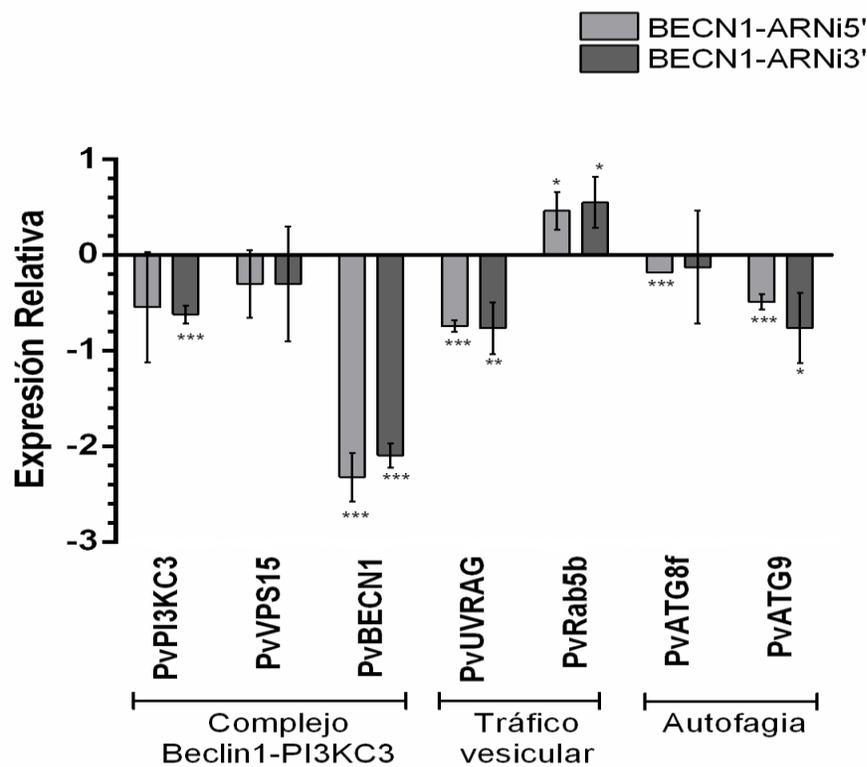


Figura 25. Perfil de expresión de algunos genes de autofagia y tráfico vesicular en el fondo silenciado de *PvBECN1*. Se determinó el patrón de expresión de *PvPI3K*, *PvVPS15*, *PvBECN1*, *PvUVRAG*, *PvRab5b*, *PvATG8f* y *PvATG9* por RT-qPCR utilizando cADN de raíces silenciadas en *PvBECN1*. Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia *EF1α*. La significancia estadística fue determinada usando la prueba *t-Student* comparando con el control (*, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Las barras representan \pm SEM (de las siglas standard error of the mean) de al menos dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas, $n=10$.

7.7 PvBECN1 podría tener un papel importante durante la senescencia del nódulo como proteína de autofagia

En plantas, siempre que se necesita determinar si una proteína participa en el proceso de autofagia, se evalúa su función durante senescencia. En el caso de la simbiosis, la senescencia es un evento que ocurre de manera natural después de la FSN tanto en nódulos determinados como indeterminados. En el caso de los nódulos determinados como los de *P. vulgaris*, se ha visto que la senescencia comienza en la zona central del nódulo y se extiende hacia la periferia hasta causar el deterioro total de este órgano (Puppo *et al.*, 2005). Debido a que probablemente haya inducción de autofagia en esta etapa, se midieron nuevamente los niveles de *PvBECN1* en nódulos senescentes y en nódulos a los que se les indujo senescencia de acuerdo al protocolo reportado por el grupo del Dr. Becana (Matamoros *et al.*, 1999) (Fig. 26). Asimismo, se midió la tasa de expresión de ATG8, una proteína involucrada en el reclutamiento y la biogénesis de autofagosomas que se ha convertido en el marcador de autofagia por excelencia en plantas debido a que es selectivamente encerrada en estas estructuras de doble membrana (Klionsky *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos muestran que, tanto en la senescencia inducida como en la senescencia normal, existe una mayor acumulación del transcrito de *PvBECN1* que de *PvATG8f*. Además, se puede observar que si existe un aumento significativo de transcrito de ambos genes en senescencia con respecto a las condiciones control. Este incremento de la expresión de *PvBECN1* y *PvATG8f* en senescencia puede deberse a que se encuentra inducido el proceso de autofagia durante la senescencia. Asimismo, los resultados obtenidos en senescencia inducida corresponden con los de senescencia normal; por lo tanto, esto sugiere que *PvBECN1* podría tener un papel fundamental durante la senescencia del nódulo simbiótico (Fig. 26).

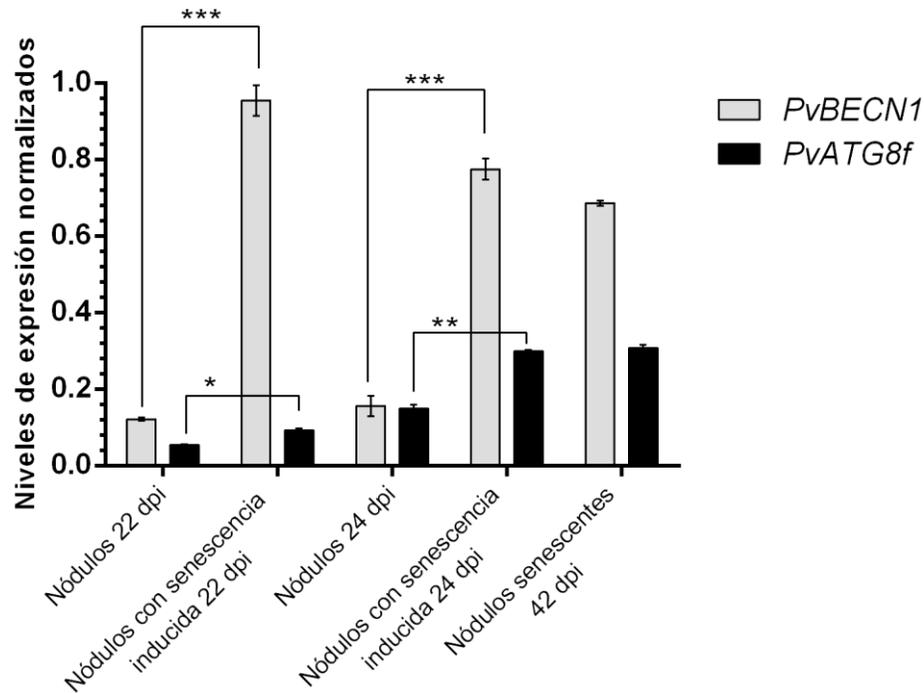


Figura 26. Perfil de expresión de *PvBECN1* y *PvATG8f* en nódulos senescentes. Se determinó el patrón de expresión de *PvBECN1* y *PvATG8f* por RT-qPCR utilizando cADN de nódulos senescentes inoculadas con *R. tropici* CIAT899. En el caso de los nódulos de 22 dpi la senescencia se indujo con 2 días de oscuridad y para los nódulos de 24 dpi la senescencia se indujo con 4 días de oscuridad. Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia *EF1α*. La significancia estadística fue determinada usando la prueba *t-Student* comparando con el control (*, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Las barras representan \pm SEM (de las siglas stándard error of the mean) de al menos tres réplicas técnicas, $n=10$.

7.8 El promotor de *PvBECN1* tiene sitios de unión a factores transcripcionales que responden a auxinas y a estrés inducido por calor, sales y patógenos

Se realizó también el análisis del promotor putativo de *PvBECN1*, el cual está formado por una secuencia de 1500pb que se ubica río arriba del ATG de inicio del gen. Este análisis se realizó considerando solamente a los motivos que han sido reportados en leguminosas como frijol común, chícharo, medicago y soya. Se encontró un total de 24 elementos regulatorios que podrían estar participando en la regulación en *cis* del gen; de los cuáles 14 tienen que ver con

funciones en transcripción y traducción, y los 10 restantes con funciones reportadas para BECN1 y con simbiosis (Tabla 2). La secuencia consenso más abundante encontrada en el promotor de *PvBECN1* fue la CAAT que corresponde al sitio de unión del factor transcripcional CAATBOX1 que es responsable de la actividad tejido específica de la proteína Leghemoglobina A (LegA).

Tabla 2. Elementos regulatorios en *cis* más importantes encontrados en la secuencia promotora de *PvBECN1*.

Factor de Transcripción	Secuencia consenso	Score*	Descripción	Referencia
ARFAT	TGTCTC	2	Sitio de unión encontrado en los promotores de genes de respuesta a auxina.	(Ulmasov, Hagen, & Guilfoyle, 1999)
AUXREPSIAA4	KGTC CAT	1	Elemento encontrado en promotores de genes que responden a ácido indolacético en meristemos de puntas de raíz.	(Ballas N, Wong LM, 1993)
CAATBOX1	CAAT	22	Secuencia consenso encontrada en el promotor de leghemoglobina A (LegA) responsable de su actividad tejido específica.	(Shirsat, Wilford, Croy, & Boulter, 1989)
CCAATBOX1	CCAAT	2	Secuencia encontrada en los promotores de genes que responden a estrés por calor.	(Rieping & Schöffl, 1992)
GT1GMSCAM4	GAAAAA	2	Secuencia encontrada en promotores de genes que responden a patógenos y estrés salino.	(Park <i>et al.</i> , 2004)
NODCON1GM	AAAGAT	3	Una de las dos secuencias consenso encontradas en genes específicos del nódulo (nodulinas).	(Sandal <i>et al.</i> , 1987)
NODCON2GM	CTCTT	2	Una de las dos secuencias consenso encontradas en genes específicos del nódulo (nodulinas).	(Sandal <i>et al.</i> , 1987)
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	3	Secuencias consenso característica de promotores activados en células infectadas de nódulos.	(Vieweg <i>et al.</i> , 2004)
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	2	Secuencias consenso característica de promotores activados en células infectadas de nódulos.	(Vieweg <i>et al.</i> , 2004)
TATABOX2	TATAAAT	6	Secuencia consenso encontrada en el promotor de leghemoglobina A (LegA) responsable de su actividad tejido específica.	(Shirsat <i>et al.</i> , 1989)

***Score** significa el número de veces que aparece el motivo en la secuencia

Asimismo, con el objetivo de conocer si *PvBECN1* pudiera ser regulada por fosforilación, se sometió a análisis su secuencia de aminoácidos al servidor NetPhos 2.0 (Blom, Gammeltoft, & Brunak, 1999) que predice los sitios con mayor

probabilidad a ser fosforilados en eucariontes considerando solo residuos de treonina (T), serina (S) y tirosina (Y). A través de éste análisis y tomando en cuenta el grado de conservación de los aminoácidos con potencial a ser fosforilados entre las BECN1 de diferentes organismos, se encontró un posible sitio de fosforilación para PvBECN1. Este sitio candidato corresponde a la serina de la posición 444 (S⁴⁴⁴) (Fig. 27). Por otro lado, recientemente se demostró en mamíferos que BECN1 presenta dos sitios de fosforilación por AMPK (AMP-activated protein kinase) que pertenecen a un motivo no canónico poco conservado entre eucariotas superiores y que regulan la activación de autofagia ante deficiencia de nutrientes (Kim *et al.*, 2013). Aunque PvBECN1 no presenta este motivo de fosforilación, si conserva los dos residuos de S/T que estarían sujetos a ser fosforilados (S¹²⁶ y T¹²⁹).

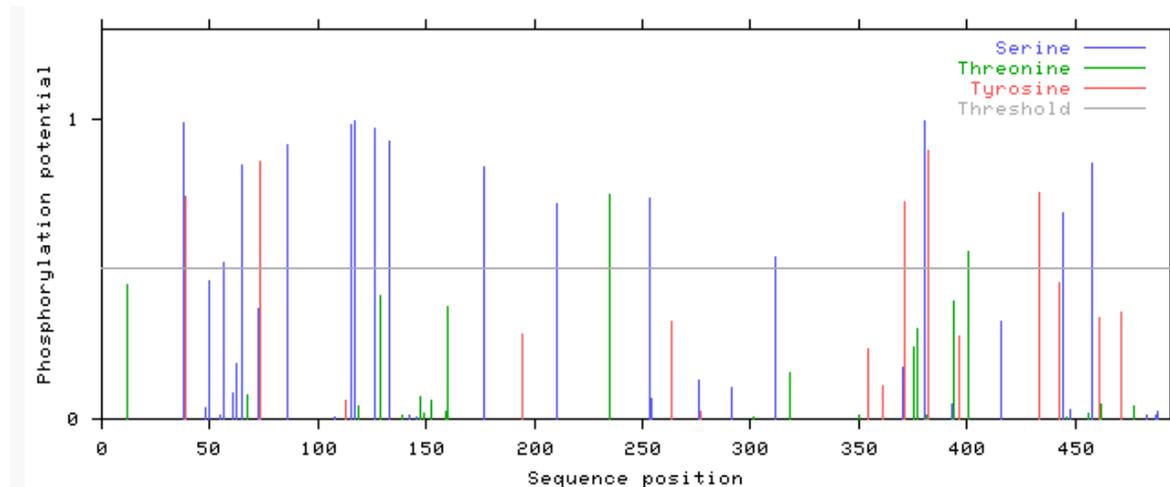


Figura 27. Sitios probables de fosforilación en la secuencia de PvBECN1. En la gráfica se muestran todos los residuos que tienen el potencial de ser fosforilados en la secuencia de PvBECN1. Sin embargo, solo aquellos que rebasan el “umbral” (línea gris horizontal), son los que presentan la mayor probabilidad de ser sitios reales de fosforilación por el contexto en el que se encuentran la proteína.

8. DISCUSIÓN

En todas las interacciones planta-microorganismo, desde las mutualistas hasta las patogénicas, el tráfico vacuolar es un tema central emergente (Teh & Hofius, 2014) debido a que es requerido para el suministro local de nuevo material de membrana o para la entrega de cargo al sitio de interacción (D. Wang & Dong, 2011; Yun & Kwon, 2012). En este contexto, proteínas que regulan diferentes vías de tráfico vesicular resultan candidatos importantes a estudiar. Una de estas proteínas es Beclina 1 (BECN1), la cual se encuentra altamente conservada entre eucariontes (Liang *et al.*, 1999) y desde su descubrimiento ha sido objeto de un gran número de investigaciones principalmente en levadura y mamíferos. Sin embargo, hasta ahora poco se sabe del papel de BECN1 en plantas, donde los escasos estudios que involucran a esta proteína en las interacciones planta-microorganismo se han enfocado principalmente en el papel que desempeña como regulador clave en mecanismos de defensa (Liu *et al.*, 2005; Patel & Dinesh-Kumar, 2008). Mientras que, en procesos simbióticos no existe ningún reporte a la fecha.

En el presente trabajo se identificó al homólogo de BECN1 en *P. vulgaris* (*PvBECN1*), y se analizó por ensayos de genética reversa el papel potencial de este gen en la simbiosis establecida con *Rhizobium*. A diferencia de lo que se ha reportado en mamíferos, donde se ha demostrado que la estructura proteica de BECN1 está constituida por los dominios BH3, CCD y ECD (Wirawan *et al.*, 2012), se encontró que *PvBECN1* solo presenta los dominios CCD y ECD al igual que todas las demás BECN1 vegetales analizadas. La ausencia del dominio BH3 en plantas podría explicar por qué aún no se han encontrado homólogos de proteínas Bcl-2 en estos organismos. No obstante, se ha sugerido que debe existir en plantas un dominio similar al BH3 que serviría como “interruptor” para modular las funciones de muerte y supervivencia por autofagia que lleva a cabo esta proteína (Seay *et al.*, 2006). De acuerdo con la inferencia filogenética, parece ser que los dominios CCD y ECD son los que le otorgan todas las características funcionales necesarias a BECN1; ya que estos dominios se encontraron en todas las

proteínas del análisis. Además, varios reportes recientes sugieren que los dominios CCD y ECD son los que permiten las múltiples interacciones de BECN1 con otras proteínas y, de esta manera, su participación en diversos procesos de señalización celular (Furuya *et al.*, 2005; Pattingre *et al.*, 2005; Sinha & Levine, 2008).

Con respecto al papel de *PvBECN1* durante la interacción simbiótica entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*, se observó que en etapas tempranas existe mayor acumulación del mensajero de este gen en respuesta a la rizobacteria; y, en etapas tardías, se repite este patrón mientras ocurre la FSN. Estos resultados obtenidos corresponden con el análisis *in silico* de *PvBECN1* realizado en el atlas de expresión génica de *P. vulgaris* (O'Rourke *et al.*, 2014) donde también se observan picos de expresión en nódulos y raíces que están participando en la interacción simbiótica. Asimismo, estos aumentos en los niveles de ARNm de BECN1 también se han observado en respuesta a patógenos. En plantas de *N. benthamiana*, el incremento ocurre rápidamente durante las etapas tempranas en hojas donde se ha inducido la MCP HR mediante Virus del Mosaico del Tabaco (VMT) (Liu *et al.*, 2005; Patel & Dinesh-Kumar, 2008). Lo mismo ocurrió en hojas de *Arabidopsis* infectadas por *Pseudomonas syringae pv. tomato*, donde la expresión de *AtBECN1* es sobre-regulada durante las etapas tempranas de la infección bacteriana (Patel & Dinesh-Kumar, 2008). Como se puede notar, BECN1 parece tener funciones fundamentales durante interacciones mutualistas y patogénicas en plantas.

La pérdida de función de *PvBECN1* en las raíces de *P. vulgaris*, ocasionó que la invasión por *Rhizobium* se viera interrumpida desde las etapas iniciales de la simbiosis por el arresto de los HI. Estos resultados coinciden con los observados en el silenciamiento de la cinasa PvPI3KC3 (Estrada-Navarrete, G., *et al.*, sin publicar) y con el secuestro metabólico de su producto PI3P ante la sobre-expresión del dominio FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1) en raíces de *P. vulgaris* (Cruz-Mireles, 2011), donde tampoco se encontraron eventos de infección exitosos o fueron muy escasos. En todos los casos, este fenotipo podría deberse a que durante los eventos de infección se encuentre afectado algún proceso de

tráfico vesicular, por ejemplo los que ocurren para favorecer el crecimiento del HI y que requieren de síntesis de membrana (Gage, 2004). Como se ha mencionado, BECN1 forma distintos complejos con PI3KC3 que participan en la regulación de diferentes vías de tráfico de membranas (Funderburk *et al.*, 2010). Por lo que, el complejo BECN1- PI3KC3 podrían tener un papel importante en la regulación del tráfico vesicular que favorecería la formación de membranas durante etapas tempranas de la simbiosis.

Por otra parte, también se observó que *PvBECN1* tiene un papel importante durante etapas tardías de la simbiosis. Ya que además de que existe un aumento en los niveles de expresión de su mensajero durante el periodo de FSN, también se acumula de manera importante en el periodo de senescencia del nódulo. De acuerdo con datos de transcriptómica, se sabe que durante la senescencia de nódulos determinados como los de frijol, existe un aumento de familias de genes involucrados principalmente en catabolismo, transporte y respuesta a defensa (Van de Velde *et al.*, 2006). Por lo que, durante estas etapas tardías, *PvBECN1* podría estar participando como una proteína importante en la regulación del reciclaje de nutrientes por autofagia.

Actualmente no existe evidencia de que BECN1 y PI3KC3 de plantas puedan interactuar directamente. Incluso, mutantes homocigotas de *Arabidopsis* para ambos genes no son viables; mientras que los fenotipos encontrados en las mutantes heterocigotas para BECN1 también fenocopian lo que ocurre con mutantes heterocigotas para PI3KC3 (Harrison-Lowe & Olsen, 2008). Esto podría sugerir una posible interacción conservada entre ambas proteínas en plantas, similar a lo que sucede en levadura. Además, esto podría ser una evidencia indirecta del papel de BECN1 en eventos que involucran la señalización de fosfoinosítidos.

Estos complejos BECN1-PI3KC3 resultan importantes principalmente por la producción y regulación de PI3P, fosfoinosítido que ha sido involucrado en el tráfico vesicular y transporte de membranas (Simonsen, Wurmser, Emr, & Stenmark, 2001). En plantas, se ha demostrado el tráfico de PI3P a través de la vía de *trans*-Golgi al lumen de la vacuola (Kim *et al.*, 2001; Meijer & Munnik, 2003),

lo que es consistente con lo reportado en otros sistemas. Sin embargo, actualmente existe controversia sobre las vías de tráfico vesicular en las que participa el complejo BECN1-PI3KC3. Esto porque a pesar de la aparente conservación de la función, ha habido trabajos donde se han complementado mutantes de levadura en ATG6 con la sobre-expresión de AtBECN1 y se ha podido restaurar la función en algunas vías de tráfico como la CPY (Fujiki *et al.*, 2007) y autofagia (Fujiki *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005). Por otra parte, otros trabajos han demostrado que la vía de tráfico vesicular de CTV en levadura no puede ser complementada y tampoco autofagia con homólogos de plantas (Harrison-Lowe & Olsen, 2008). Probablemente, los componentes de los complejos en levadura y plantas tienen funciones generales que no son completamente intercambiables en sistemas heterólogos.

Aunque BECN1 ha sido relacionada principalmente con autofagia, cada vez existe mayor evidencia que demuestra que esta proteína lleva a cabo funciones independientes de este proceso y que tienen que ver con otras vías de tráfico vesicular; lo cual, podría estar sucediendo en los fenotipos encontrados ante la pérdida de función de *PvBECN1* en etapas tempranas de la simbiosis. Sin embargo, más experimentos deben ser realizados para comprobar esta hipótesis debido a que el silenciamiento de *PvBECN1* ocasiona cambios en la expresión de genes que participan tanto en vías autofágicas (*PvPI3KC3*, *PvVPS15*, *PvATG8f*, *PvATG9*), como en vías no autofágicas (*PvPI3KC3*, *PvVPS15*, *PvUVRAG*, *PvRab5b*). En *Arabidopsis*, mutantes en BECN1 presentan sobre-regulación en la expresión de genes involucrados en el tráfico de membranas como *AtPI3KC3*, *AtVPS15*, *AtATG3*, *AtATG4a*, *AtATG5*, *AtATG7*, *AtATG8d* y *AtATG8i*; lo cual contribuye a la falla en la germinación del polen y al desarrollo en estas plantas. Incluso, en este mismo reporte a través de un análisis de “Affimetrix chip” se vio que la pérdida de función de *AtBECN1* altera la expresión de casi 3,000 genes (Qin *et al.*, 2007). Resulta muy interesante cómo BECN1 puede regular la expresión de otros genes. Probablemente esto ocurre debido a que la alteración del metabolismo y la vía de señalización de fosfoinosítidos juegan un papel

importante en la regulación de diferentes procesos, lo cual explicaría los fenotipos pleiotrópicos reportados hasta ahora en estas plantas deficientes en *BECN1*.

El silenciamiento de *PvBECN1* en etapas tempranas también mostró alteraciones en la estructura de pelos radicales y en la división de las células del córtex externo de la raíz. En ambos casos, además de las funciones en tráfico vesicular que podría estar realizando esta proteína, debe considerarse la función reciente atribuida a PI3P y al Complejo BECN1-PI3K con la regulación de proteínas que participan en la polimerización de actina (Gallop, Walrant, Cantley, & Kirschner, 2013; Xia *et al.*, 2013). De hecho se sabe que los fosfoinosítidos como PI3P son esenciales para la ubicación del citoesqueleto de actina y para el proceso de endocitosis, los cuales ocurren continuamente (Monteiro *et al.*, 2005) y a través de procesos que no son dependientes de autofagia (Harrison-Lowe & Olsen, 2008). Estos fenotipos encontrados en etapas tempranas de la simbiosis explican que al evaluar la pérdida de función en etapas tardías se haya observado una reducción importante en el número de nódulos y primordios. No obstante, es importante considerar en estos resultados de silenciamiento que los niveles de ARNm de *PvBECN1* no se redujeron hasta cero, lo cual deja la posibilidad de que existan niveles de actividad residual de la proteína.

Por otro lado, ante la importancia que tiene BECN1 en diferentes procesos de señalización celular, se ha sugerido que debe ser regulada de diferentes maneras y tal regulación debe ser muy estricta. A través de predicciones bioinformáticas se encontró que *PvBECN1* puede ser regulada transcricionalmente en respuesta a auxinas y a estrés por calor, sales y patógenos, tales condiciones tienen relación con todas las funciones predichas para esta proteína en plantas (Fujiki *et al.*, 2007; Harrison-Lowe & Olsen, 2008; Liu *et al.*, 2005; Patel & Dinesh-Kumar, 2008; Qin *et al.*, 2007; Rana *et al.*, 2012). Asimismo, *PvBECN1* podría ser regulada post-traduccionalmente por fosforilación, ya que en mamíferos se ha reportado este tipo de regulación ante condiciones de estrés por falta de nutrientes (Joungmok Kim *et al.*, 2013; Russell *et al.*, 2013; Zalckvar *et al.*, 2009). El análisis *in silico* arrojó que *PvBECN1* presenta tres posibles sitios de fosforilación, los cuales son: S¹²⁶, T¹²⁹ y S⁴⁴⁴. Resultaría muy

importante estudiar todos estos mecanismos de regulación transcripcional y post-traducciona de *PvBECN1* en el contexto de la regulación de esta proteína durante las interacciones planta-microorganismo.

PvBECN1 es una proteína que juega un papel muy importante durante etapas tempranas y tardías de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*. Existen varios reportes de mutantes de leguminosas que muestran tal relevancia durante la interacción simbiótica. Generalmente, estas mutantes pueden formar nódulos pero la mayoría de los nódulos no están infectados, al menos durante las etapas tempranas de la simbiosis. Estas mutantes también presentan defectos en la infección que incluyen la pérdida de la capacidad para iniciar el foco de infección (*nin*, *nsp1*, *nsp2*), algunas otras forman el foco de infección pero muy pocos HI (*cyclops*, *ern1*), y otras más presentan HI anormales o arrestados (*lin/cerberus*, *vapyrin*, *rpg*, *nap1*, *pir1*, *symrem1*) (Oldroyd *et al.*, 2011), como lo observado en el silenciamiento de *PvBECN1*. El estudio de genes que participan en procesos como el tráfico vesicular y autofagia, empleando además herramientas de genética reversa en leguminosas, son muy importantes en el entendimiento de las relaciones simbióticas como esta. Sin embargo, estos estudios requieren de la integración de los métodos moleculares, bioquímicos, celulares y fisiológicos con los “ómicos”, para aspirar a desarrollar en un futuro próximo tecnologías sustentables que nos permitan mejorar y extender la FSN que llevan a cabo las leguminosas.

9. CONCLUSIONES

- *Phaseolus vulgaris* solo presenta un homólogo de BECN1 en su genoma, cuya estructura proteica se conforma por los dominios CCD y ECD.
- La abundancia de transcrito de *PvBECN1* varía en respuesta a la inoculación con *Rhizobium* y durante la ontogenia del nódulo, teniendo sus mayores aumentos pocas horas después de la inoculación y durante el periodo de Fijación Simbiótica de Nitrógeno.
- La pérdida de función de *PvBECN1* perjudica la progresión del hilo de infección (HI) en raíces de *P. vulgaris*. Lo cual provoca la reducción en el número de nódulos y primordios de nódulo en las raíces silenciadas y a que no se mantiene la división mitótica en las células corticales.
- La pérdida de función de *PvBECN1* cambia los niveles de expresión genes involucrados en autofagia y otras vías de tráfico vesicular.
- *PvBECN1* podría tener un papel importante durante la senescencia del nódulo como proteína regula el reciclaje de nutrientes por autofagia.
- *PvBECN1* podría ser regulada transcripcionalmente por factores transcripcionales que responden a auxinas y a estrés inducido por calor, sales y patógenos. Además, podría ser regulada post-transcripcionalmente por fosforilación.

10. PERSPECTIVAS

- Monitorear en pelos radicales vivos (*Single- Cell System*) de *P. vulgaris* con pérdida de función en *PvBECN1* algunas vías de tráfico vesicular y autofagia utilizando colorantes específicos (FM4-64, LysoTracker) en presencia y ausencia de *Rhizobium*.
- Analizar la localización de *PvATG8-GFP* (marcador de autofagia por excelencia en plantas y animales) en raíces con pérdida de función en *PvBECN1* durante la ontogenia del nódulo.
- Monitorear en pelos radicales con pérdida de función en *PvBECN1* la polimerización de microfilamentos utilizando la sonda molecular de unión a actina *LifeAct-GFP*.
- Determinar la localización de *PvBECN1* en las raíces de *P. vulgaris* y durante el proceso de nodulación mediante la expresión de *PvBECN1-GFP* en raíces transgénicas de *P. vulgaris*, bajo el control transcripcional del promotor nativo. También se podrían utilizar anticuerpos específicos contra *PvBECN1*, para llevar a cabo su inmunolocalización.
- Determinar la función de *PvBECN1* durante la FSN y senescencia a través del silenciamiento del gen en etapas tardías de la simbiosis. Una estrategia para hacerlo sería a través de la generación de un ARNi para *PvBECN1* que se encuentre bajo un promotor inducible.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adi-Harel, S., Erlich, S., Schmukler, E., Cohen-Kedar, S., Segev, O., Mizrachy, L., ... Pinkas-Kramarski, R. (2010). Beclin 1 self-association is independent of autophagy induction by amino acid deprivation and rapamycin treatment. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(5), 1262–71.
- Ballas N, Wong LM, T. A. (1993). Identification of the auxin-responsive element, AuxRE, in the primary indoleacetic acid-inducible gene, PS-IAA4/5, of pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol*, 233, 580–596.
- Bapaume, L., & Reinhardt, D. (2012). How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Frontiers in Plant Science*, 3(October), 1–29.
- Bassham, D. C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L. J., & Yoshimoto, K. (2006). Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy*, 2(1), 2–11.
- Bibikova, T. N., Blancaflor, E. B., & Gilroy, S. (1999). Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 17(6), 657–65.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., ... Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), E788–96.
- Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, 294(5), 1351–62.
- Brewin, N. J. (2004). Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(4), 293–316.
- Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J. T., Maolanon, N., ... Stougaard, J. (2012). Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13859–64.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55–128.
- Burman, C., & Ktistakis, N. T. (2010). Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Letters*, 584(7), 1302–1312.
- Cao, Y., & Klionsky, D. J. (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Research*, 17(10), 839–49.
- Copetti, T., Bertoli, C., Dalla, E., Demarchi, F., & Schneider, C. (2009). p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2594–608.

- Cruz-Mireles, N. (2011). *Patrones de expresión y localización de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) durante la simbiosis entre Phaseolus vulgaris y Rhizobium*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Denancé, N., Szurek, B., & Noël, L. D. (2014). Emerging functions of nodulin-like proteins in non-nodulating plant species. *Plant & Cell Physiology*, 55(3), 469–74.
- Dupont, L., Alloing, G., & Pierre, O. (2012). The legume root nodule: from symbiotic nitrogen fixation to senescence. In *in Tech* (pp. 137–168).
- Eisenberg-Lerner, a, & Kimchi, a. (2012). PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell Death and Differentiation*, 19(5), 788–97.
- Emerich, D. W., & Krishnan, H. B. (2014). Symbiosomes: temporary moonlighting organelles. *The Biochemical Journal*, 460(1), 1–11.
- Esseling, J. J., Lhuissier, F. G. P., & Emons, A. M. C. (2003). Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiology*, 132(4), 1982–8.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., ... Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of Phaseolus spp. by Agrobacterium rhizogenes. *Nature Protocols*, 2(7), 1819–24.
- Ezougou, C. N., Ben-Rached, F., Moss, D. K., Lin, J.-W., Black, S., Knuepfer, E., ... Langsley, G. (2014). Plasmodium falciparum Rab5B is an N-terminally myristoylated Rab GTPase that is targeted to the parasite's plasma and food vacuole membranes. *PloS One*, 9(2), e87695.
- Fogel, A. I., Dlouhy, B. J., Wang, C., Ryu, S.-W., Neutzner, A., Hasson, S. a, ... Youle, R. J. (2013). Role of membrane association and Atg14-dependent phosphorylation in beclin-1-mediated autophagy. *Molecular and Cellular Biology*, 33(18), 3675–88.
- Fournier, J., Timmers, A. C. J., Sieberer, B. J., Jauneau, A., Chabaud, M., & Barker, D. G. (2008). Mechanism of infection thread elongation in root hairs of Medicago truncatula and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology*, 148(4), 1985–95.
- Fujiki, Y., Yoshimoto, K., & Ohsumi, Y. (2007). An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiology*, 143(3), 1132–9.
- Funderburk, S. F., Wang, Q. J., & Yue, Z. (2010). The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in Cell Biology*, 20(6), 355–62.
- Furuya, N., Byfield, M., Pattingre, S., & Levine, B. (2005). The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy*, 1(June), 46–52.
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(2), 280–300.
- Gallop, J. L., Walrant, A., Cantley, L. C., & Kirschner, M. W. (2013). Phosphoinositides and membrane curvature switch the mode of actin polymerization via selective recruitment of toca-

- 1 and Snx9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), 7193–8.
- Gannagé, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Rämer, P. C., ... Münz, C. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host & Microbe*, 6(4), 367–80.
- Gaut, B. S. (2014). The complex domestication history of the common bean. *Nature Genetics*, 46(7), 663–4.
- Geurts, R., Fedorova, E., & Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 346–52.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., ... Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D1178–86.
- Gutjahr, C., & Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(29), 593–617.
- Harrison-Lowe, N. J., & Olsen, L. J. (2008). Autophagy protein 6 (ATG6) is required for pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy*, 4(3), 339–48.
- Hayward, A. P., & Dinesh-Kumar, S. P. (2011). What can plant autophagy do for an innate immune response? *Annual Review of Phytopathology*, 49, 557–76.
- He, C., & Levine, B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 140–9.
- Ivanov, S., & Fedorova, E. (2012). Rhizobium–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceedings of the ...*, 1–6.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(8), 619–33.
- Jurgens, G. (2004). Membrane trafficking in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 481–504.
- Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998). Apg14p and Apg6/Vps30p Form a Protein Complex Essential for Autophagy in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22284–22291.
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), 571–80.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Reports*, 2(4), 330–5.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 152(3), 519–30.

- Kim, D. H., Eu, Y. J., Yoo, C. M., Kim, Y. W., Pih, K. T., Jin, J. B., ... Hwang, I. (2001). Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *The Plant Cell*, *13*(2), 287–301.
- Kim, J., Kim, Y. C., Fang, C., Russell, R. C., Kim, J. H., Fan, W., ... Guan, K.-L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, *152*(1-2), 290–303.
- Kim, J., Lee, H., Lee, H. N., Kim, S.-H., Shin, K. D., & Chung, T. (2013). Autophagy-related proteins are required for degradation of peroxisomes in *Arabidopsis* hypocotyls during seedling growth. *The Plant Cell*, *25*(12), 4956–66.
- Kim, J., & Rees, D. C. (1992). Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5077), 1677–82.
- Klionsky, D. J., Baehrecke, E. H., Brummell, J. H., Chu, C. T., Codogno, P., Cuervo, A. M., ... Tooze, S. A. (2011). A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy*, *7*(11), 1273–94.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C., & Maier, U.-G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes--new models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*, *7*(1), 55.
- Kusama, Y., Sato, K., Kimura, N., Mitamura, J., Ohdaira, H., & Yoshida, K. (2009). Comprehensive analysis of expression pattern and promoter regulation of human autophagy-related genes. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, *14*(10), 1165–75.
- Kyei, G. B., Dinkins, C., Davis, A. S., Roberts, E., Singh, S. B., Dong, C., ... Deretic, V. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *The Journal of Cell Biology*, *186*(2), 255–68.
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, *6*(4), 463–77.
- Li, F., & Vierstra, R. D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science*, *17*(9), 526–37.
- Li, Z., Chen, B., Wu, Y., Jin, F., Xia, Y., & Liu, X. (2010). Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors. *BMC Cancer*, *10*(1), 98.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *402*(December), 1–5.
- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., ... Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of Virology*, *72*(11), 8586–96.
- Limpens, E., Ivanov, S., van Esse, W., Voets, G., Fedorova, E., & Bisseling, T. (2009). Medicago N₂-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *The Plant Cell*, *21*(9), 2811–28.
- Lindmo, K., & Stenmark, H. (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *Journal of Cell Science*, *119*(Pt 4), 605–14.

- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121(4), 567–77.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–8.
- Matamoros, M. A., Baird, L. M., Escuredo, P. R., Dalton, D. A., Minchin, F. R., Iturbe-Ormaetxe, I., ... Becana, M. (1999). Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiology*, 121(1), 97–112.
- Matile, P., & Winkenbach, F. (1971). Function of Lysosomes and Lysosomal Enzymes in the Senescing Corolla of the Morning Glory (*Ipomoea purpurea*). *Journal of Experimental Botany*, 22(4), 759–771.
- Meijer, H. J. G., & Munnik, T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 265–306.
- Miyahara, A., Richens, J., Starker, C., Morieri, G., Smith, L., Long, S., ... Oldroyd, G. E. D. (2010). Conservation in function of a SCAR/WAVE component during infection thread and root hair growth in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 23(12), 1553–62.
- Monteiro, D., Castanho Coelho, P., Rodrigues, C., Camacho, L., Quader, H., & Malhó, R. (2005). Modulation of endocytosis in pollen tube growth by phosphoinositides and phospholipids. *Protoplasma*, 226(1-2), 31–8.
- Muñoz, J. A., Coronado, C., Pérez-Hormaeche, J., Kondorosi, A., Ratet, P., & Palomares, A. J. (1998). MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa-*Rhizobium meliloti* interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9687–92.
- O'Rourke, J. A., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., Jackson, S. A., ... Vance, C. P. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics*, 15, 866.
- Obara, K., & Ohsumi, Y. (2011). Atg14: a key player in orchestrating autophagy. *International Journal of Cell Biology*, 2011, 713435.
- Obara, K., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2006). Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes-- Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), 1527–39.
- Oldroyd, G. (2001). Dissecting Symbiosis: Developments in Nod Factor Signal Transduction. *Annals of Botany*, 87(6), 709–718.
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119–44.
- Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Rodríguez-Kessler, M., Zamudio, F. Z., ... Sánchez, F. (2011). Nodulin 41, a novel late nodulin of common bean with peptidase activity. *BMC Plant Biology*, 11(1), 134.

- Park, H. C., Kim, M. L., Kang, Y. H., Jeon, J. M., Yoo, J. H., Kim, M. C., ... Cho, M. J. (2004). Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCA4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiology*, *135*(4), 2150–61.
- Patel, S., & Dinesh-Kumar, S. P. (2008). Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy*, *4*(1), 20–7.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., ... Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, *122*(6), 927–39.
- Péllissier, H. C., Frerich, A., Desimone, M., Schumacher, K., & Tegeder, M. (2004). PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of French bean. *Plant Physiology*, *134*(2), 664–75.
- Perrine-Walker, F. M., Lartaud, M., Kouchi, H., & Ridge, R. W. (2014). Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the Mesorhizobium-Lotus symbiosis. *Protoplasma*, *251*(5), 1099–111.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, *8*(10), 785–6.
- Petrásek, J., & Schwarzerová, K. (2009). Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(6), 728–34.
- Pladys, D., & Vance, C. P. (1993). Proteolysis during Development and Senescence of Effective and Plant Gene-Controlled Ineffective Alfalfa Nodules. *Plant Physiology*, *103*(2), 379–384.
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., ... Finn, R. D. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, *40*(Database issue), D290–301.
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M. M., ... Foyer, C. H. (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *The New Phytologist*, *165*(3), 683–701.
- Qin, G., Ma, Z., Zhang, L., Xing, S., Hou, X., Deng, J., ... Gu, H. (2007). Arabidopsis AtBECLIN1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Research*, *17*(3), 249–63.
- Rameh, L. E., & Cantley, L. C. (1999). The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(13), 8347–8350.
- Rana, R. M., Dong, S., Ali, Z., Huang, J., & Zhang, H. S. (2012). Regulation of ATG6/Beclin-1 homologs by abiotic stresses and hormones in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics and Molecular Research : GMR*, *11*(4), 3676–87.
- Rieping, M., & Schöffl, F. (1992). Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced expression of chimaeric heat shock genes in transgenic tobacco. *Molecular & General Genetics : MGG*, *231*(2), 226–32.
- Robertson, J., & Lyttleton, P. (1982). Coated and smooth vesicles in the biogenesis of cell walls, plasma membranes, infection threads and peribacteroid membranes in root hairs and nodules. *Journal of Cell Science*, *78*, 63–78.

- Rodríguez-Llorente, I. D., Pérez-Hormaeche, J., El Mounadi, K., Dary, M., Caviedes, M. A., Cosson, V., ... Palomares, A. J. (2004). From pollen tubes to infection threads: recruitment of *Medicago* floral pectic genes for symbiosis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 39(4), 587–98.
- Rohrig, H., Schmidt, J., Miklashevichs, E., Schell, J., & John, M. (2002). Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 1915–20.
- Rosendahl, L., Glenn, A. R., & Dilworth, M. J. (1991). Organic and inorganic inputs into legume root nodule nitrogen fixation., 259–291.
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., ... Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature Cell Biology*, 15(7), 741–50.
- Samaj, J., Müller, J., Beck, M., Böhm, N., & Menzel, D. (2006). Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science*, 11(12), 594–600.
- Sandal, N. N., Bojsen, K., & Marcker, K. A. (1987). A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucleic Acids Research*, 15(4), 1507–19.
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., ... Jackson, S. A. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), 178–83.
- Schultze, M., & Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics*, 32, 33–57.
- Seay, M., Patel, S., & Dinesh-Kumar, S. P. (2006). Autophagy and plant innate immunity. *Cellular Microbiology*, 8(6), 899–906.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1567–72.
- Shi, C.-S., & Kehrl, J. H. (2010). TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Science Signaling*, 3(123), ra42.
- Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R., & Boulter, D. (1989). Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Molecular & General Genetics: MGG*, 215(2), 326–31.
- Simonsen, A., Wurmser, A. E., Emr, S. D., & Stenmark, H. (2001). The role of phosphoinositides in membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(4), 485–92.
- Singh, S. P., Pandey, T., Srivastava, R., Verma, P. C., Singh, P. K., Tuli, R., & Sawant, S. V. (2010). BECLIN1 from *Arabidopsis thaliana* under the generic control of regulated expression systems, a strategy for developing male sterile plants. *Plant Biotechnology Journal*, 8(9), 1005–22.
- Sinha, S., & Levine, B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S137–48.

- Smith, L. G., & Oppenheimer, D. G. (2005). Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 271–95.
- Soyano, T., & Hayashi, M. (2014). Transcriptional networks leading to symbiotic nodule organogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 146–54.
- Stack, J. H., Herman, P. K., Schu, P. V., & Emr, S. D. (1993). A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *The EMBO Journal*, 12(5), 2195–204.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–9.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K. M., Cheh, C.-W., Farkas, A., Loughran, P., ... Lotze, M. T. (2010). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 190(5), 881–92.
- Teh, O. K., & Hofius, D. (2014). Membrane trafficking and autophagy in pathogen-triggered cell death and immunity. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1297–1312.
- Timmers, A. C., Auriac, M. C., & Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development (Cambridge, England)*, 126(16), 3617–28.
- Timmers, A. C., Soupène, E., Auriac, M. C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., & Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 13(11), 1204–13.
- Tooze, S. A., & Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology*, 12(9), 831–5.
- Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 781–805.
- Ulmasov, T., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 19(3), 309–19.
- Valdés-López, O., Arenas-Huertero, C., Ramírez, M., Girard, L., Sánchez, F., Vance, C. P., ... Hernández, G. (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant, Cell & Environment*, 31(12), 1834–43.
- Van de Velde, W., Guerra, J. C. P., De Keyser, A., De Rycke, R., Rombauts, S., Maunoury, N., ... Goormachtig, S. (2006). Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 141(2), 711–20.
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., ... Mergaert, P. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5969), 1122–6.
- Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 124–42.

- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., & Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(5), 329–41.
- Verma, D. P., Kazazian, V., Zogbi, V., & Bal, A. K. (1978). Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *The Journal of Cell Biology*, 78(3), 919–36.
- Vieweg, M. F., Frühling, M., Quandt, H.-J., Heim, U., Bäumllein, H., Pühler, A., ... Andreas, M. P. (2004). The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 17(1), 62–9.
- Vinuesa, P., Neumann-Silkow, F., Pacios-Bras, C., Spaink, H. P., Martínez-Romero, E., & Werner, D. (2003). Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 16(2), 159–68.
- Wang, B., Ling, S., & Lin, W.-C. (2010). 14-3-3Tau regulates Beclin 1 and is required for autophagy. *PLoS One*, 5(4), e10409.
- Wang, C., Wang, Y., McNutt, M. A., & Zhu, W.-G. (2011). Autophagy process is associated with anti-neoplastic function. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(6), 425–32.
- Wang, D., & Dong, X. (2011). A highway for war and peace: the secretory pathway in plant-microbe interactions. *Molecular Plant*, 4(4), 581–7.
- Wang, X. (2004). Lipid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 329–36.
- Wang, X., Teng, Y., Wang, Q., Li, X., Sheng, X., Zheng, M., ... Lin, J. (2006). Imaging of dynamic secretory vesicles in living pollen tubes of *Picea meyeri* using evanescent wave microscopy. *Plant Physiology*, 141(4), 1591–603.
- Weerasinghe, R. R., Collings, D. A., Johannes, E., & Allen, N. S. (2003). The distributional changes and role of microtubules in Nod factor-challenged *Medicago sativa* root hairs. *Planta*, 218(2), 276–87.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., & Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell*, 30(6), 678–88.
- Wirawan, E., Lippens, S., Vanden Berghe, T., Romagnoli, A., Fimia, G. M., Piacentini, M., & Vandenabeele, P. (2012). Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy*, 8(1), 6–17.
- Xia, P., Wang, S., Du, Y., Zhao, Z., Shi, L., Sun, L., ... Fan, Z. (2013). WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. *The EMBO Journal*, 32(20), 2685–96.
- Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1102–9.
- Yang, W. C., Horvath, B., Hontelez, J. G. J., Kammen, & Bisseling, T. (1991). In situ localization of *Rhizobium* mRNAs in pea root nodules: *nifA* and *nifH* localization.

- Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L. H., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., ... Stougaard, J. (2009). Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *The Plant Cell*, 21(1), 267–84.
- Yun, H. S., & Kwon, C. (2012). Trafficking at the host cell surface during plant immune responses. *Journal of Plant Biology*, 55(3), 185–190.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Eisenstein, M., & Kimchi, A. (2009). Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy*, 5(5), 720–2.
- Zeng, X., Overmeyer, J. H., & Maltese, W. a. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 2), 259–70.
- Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Li, B., Chen, Y., Ren, X., ... Yang, J.-M. (2009). Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*, 5(6), 816–23.

12. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

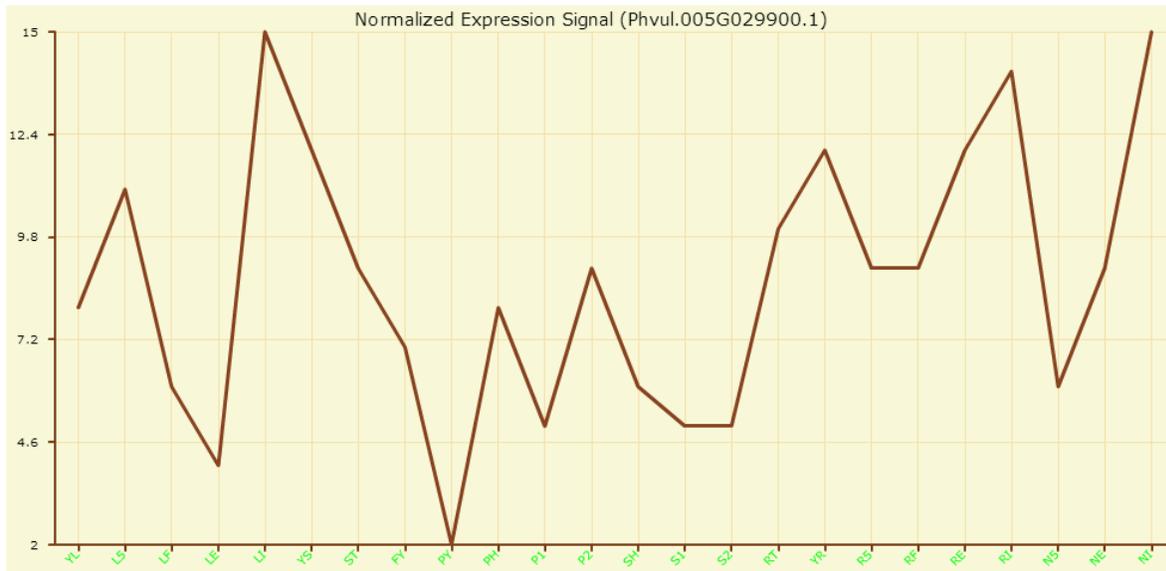
Tabla Suplementaria I. Oligonucleótidos de RT-qPCR

Nombre del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia
PvEF1α	qPvEF1aFor	5'-GGTCATTGGTCATGTCGACTCTGG-3'
	qPvEF1aRev	5'-GCACCCAGGCATACTTGAATGACC-3'
PvBECN1	qPvBECN1For	5'-CTGCCGCAATCCTCTCTGCATC-3'
	qPvBECN1Rev	5'-CACACTGCTGGCACCATGAACG-3'
PvPI3K	qPvPI3Kfor	5'-GGCAGCTGGTGTGAATGGAGAG-3'
	qPvPI3Krev	5'-CAACTGAGCTGTCAATTCAGTCTGG-3'
PvWPS15	qPvWPS15For	5'-GCAAGCAAGAGAATACTGCCAAGAG-3'
	qPvWPS15Rev	5'-GCTATGCCTCTTCTCTAGCATCAGG-3'
PvUVRAG	qPvUVRAGFor	5'-CAAACCAGATTCTGTCATTGCGGACCACC -3'
	qPvUVRAGRev	5'-GCTCCTCTTCTGGTTGGCTTGGGC-3'
PvRab5b	qPvRab5bFor	5'-CGATCGGACACAACAACCTCAATGCAAAATTGGTTCTTC-3'
	qPvRab5bRev	5'-TGTCTGCGAAAAGAATGCTGCCCTATTGTTGA-3'
PvATG8f	qPvATG8fFor	5'-TCCCTGCTGACCTGACTATTGG-3'
	qPvATG8fRev	5'-TGTAGGAGGAAGGACGTTGTCC-3'
PvATG9	qPvATG9For	5'-GCGACTTCCACATCCGTTCCC-3'
	qPvATG9Rev	5'-CAATGACTGCTGGTAGTATGGGTC-3'

Tabla Suplementaria II. Identificadores de las BECN1 de diferentes organismos

Organismo	Gene ID	Base de datos
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phvul.005G029900	Phytozome
<i>Glycine max</i>	Glyma11g21490	Phytozome
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr3g018770	Phytozome
<i>Malus domestica</i>	MDP0000148882	Phytozome
<i>Vitis vinífera</i>	GSVIVG01027092001	Phytozome
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT3G61710	Phytozome
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc05g050390	Phytozome
<i>Salanum tuberosum</i>	PGSC0003DMG400017986	Phytozome
<i>Oryza sativa</i>	Os03g44200	Phytozome
<i>Triticum aestivum</i>	CAJ27517.1	Gene Bank
<i>Saccharum officiarum</i>	CAJ27516.1	Gene Bank
<i>Sorghum bicolor</i>	Sobic.003G408500	Phytozome
<i>Zae mayz</i>	GRMZM2G092112	Phytozome
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cre01.g020250	Phytozome
<i>Volvox carteri</i>	Vocar20010200m	Phytozome
<i>Schistosoma mansoni</i>	CAJ19743.1	Gene Bank
<i>Aedes aegypti</i>	XP_001654535.1	Gene Bank
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_651209.1	Gene Bank
<i>Oryzias latipes</i>	NP_001098248.1	Gene Bank
<i>Mus musculus</i>	NP_062530.2	Gene Bank
<i>Homo sapiens</i>	NP_003757.1	Gene Bank
<i>Pan triglodytes</i>	XP_511522.2	Gene Bank
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	NP_015205.1	Gene Bank
<i>Sacharomyces paradoxus</i>	CAJ26345.1	Gene Bank

Figura Suplementaria I. Expresión génica de *PvBECN1* de acuerdo al atlas de expresión génica de *P. vulgaris* (O'Rourke, J.A., et al, 2014)



- YL- Fully expanded 2nd trifoliolate leaf tissue from plants provided with fertilizer
- L5- Leaf tissue collected 5 days after plants were inoculated with effective rhizobium
- LF- Leaf tissue from fertilized plants collected at the same time of LE and LI
- LE- Leaf tissue collected 21 days after plants were inoculated with effective rhizobium
- LI- Leaf tissue collected 21 days after plants were inoculated with ineffective rhizobium
- YS- All stem internodes above the cotyledon collected at the 2nd trifoliolate stage
- ST- Shoot tip, including the apical meristem, collected at the 2nd trifoliolate stage
- FY- Young flowers, collected prior to floral emergence
- PY- Young pods, collected 1 to 4 days after floral senescence. Samples contain developing embryos at globular stage
- PH- Pods approximately 9cm long, associated with seeds at heart stage (pod only)
- P1- Pods between 10 and 11 cm long, associated with stage 1 seeds (pod only)
- P2- Pods between 12 and 13 cm long associated with stage 2 seeds (pod only)
- SH- Heart stage seeds, between 3 and 4 mm across and approximately 7 mg
- S1- Stage 1 seeds, between 6 and 7 mm across and approximately 50 mg
- S2- Stage 2 seeds, between 8 and 10 mm across and between 140 and 150 mg
- RT- Root tips, 0.5 cm of tissue, collected from fertilized plants at 2nd trifoliolate stage of development.
- YR- Whole roots, including root tips, collected at the 2nd trifoliolate stage of development
- R5- Whole roots separated from 5 day old pre-fixing nodules
- RF- Whole roots from fertilized plants collected at the same time as RE and RI
- RE- Whole roots separated from fix+ nodules collected 21 days after inoculation
- RI- Whole roots separated from fix- nodules collected 21 days after inoculation
- N5- Pre-fixing (effective) nodules collected 5 days after inoculation
- NE- Effectively fixing nodules collected 21 days after inoculation
- NI- Ineffectively fixing nodules collected 21 days after inoculation

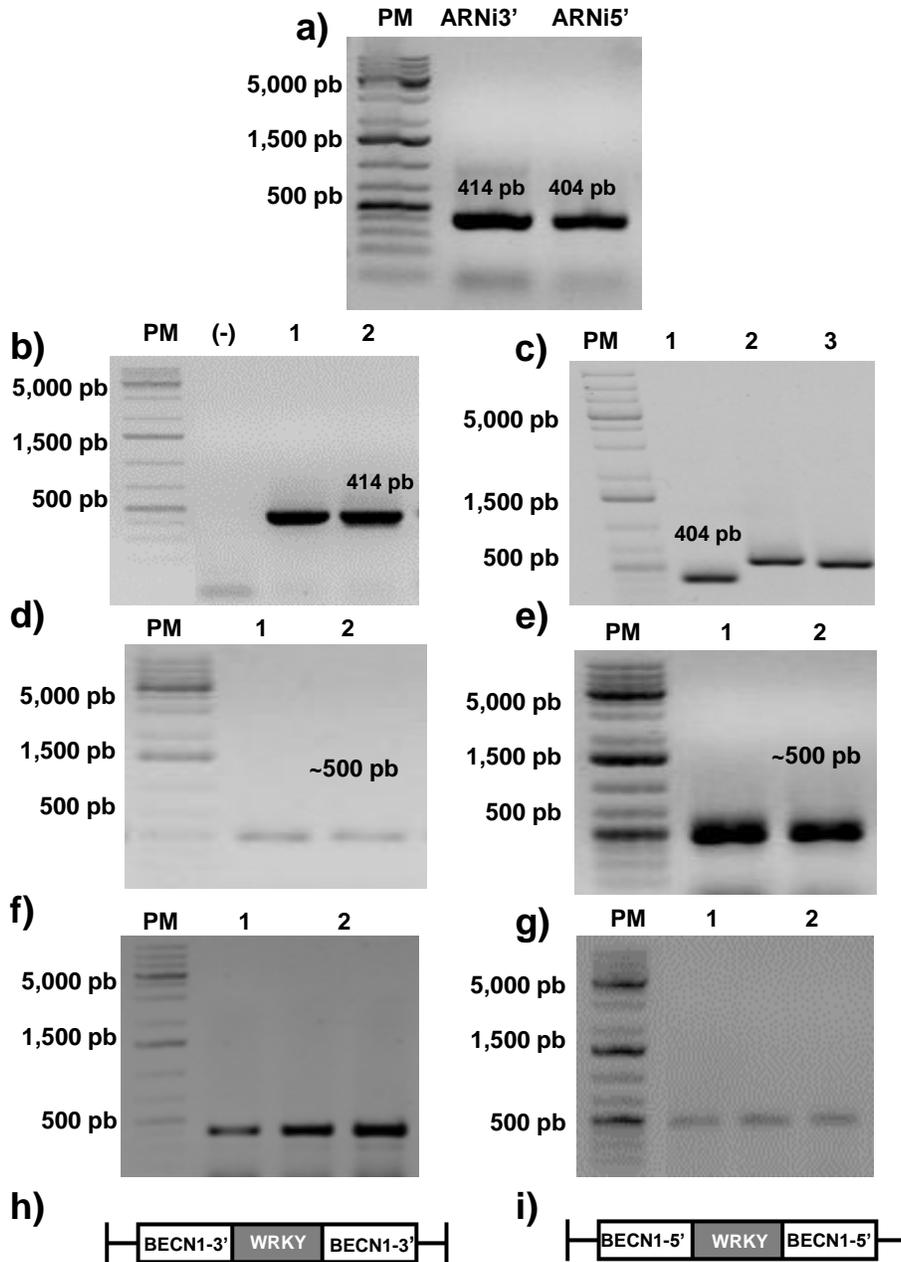


Figura Suplementaria II. Construcción de dos ARN de interferencia para el mensajero de *PvBECN1*. En a) se muestra la amplificación del fragmento ARNi3' (BECN1-3') y ARNi5' (BECN1-5') para el silenciamiento de *PvBECN1*, el PCR se realizó a partir de cDNA de raíces jóvenes. En b) y en c) se muestra el resultado del PCR que comprueba la clonación de BECN1-3' y BECN1-5' en pENTR™/D-TOPO, respectivamente. En d) y e) se muestra el resultado del PCR que comprueba la clonación de pENTR-BECN1-3' y pENTR-BECN1-5' en el vector pTDT-DC-RNAi, respectivamente. En f) y g) se muestra el resultado del PCR que comprueba la transformación de *A. rhizogenes* K599 con BECN1-RNAi3' y BECN1-RNAi5', respectivamente. En todos los casos, las reacciones de PCR se realizaron usando los oligonucleótidos específicos del inserto y los oligonucleótidos específicos del vector (oligonucleótidos M13 para pENTR y WRKY para pTDT-DC-RNAi) para al menos 20 colonias de *E. coli* DH5 α seleccionadas para el "screening", en cada gel solo se observan los resultados positivos de hasta 3 colonias distintas. Gel de agarosa al 1%-TBE1X, teñido con Br-Et. PM, Marcador de peso molecular, (-) control negativo. En h) e i) se muestra la estructura de los ARNi construidos, que constan del intrón WRKY flanqueado en los extremos por dos secuencias de *PvBECN1*RNAi invertidas.

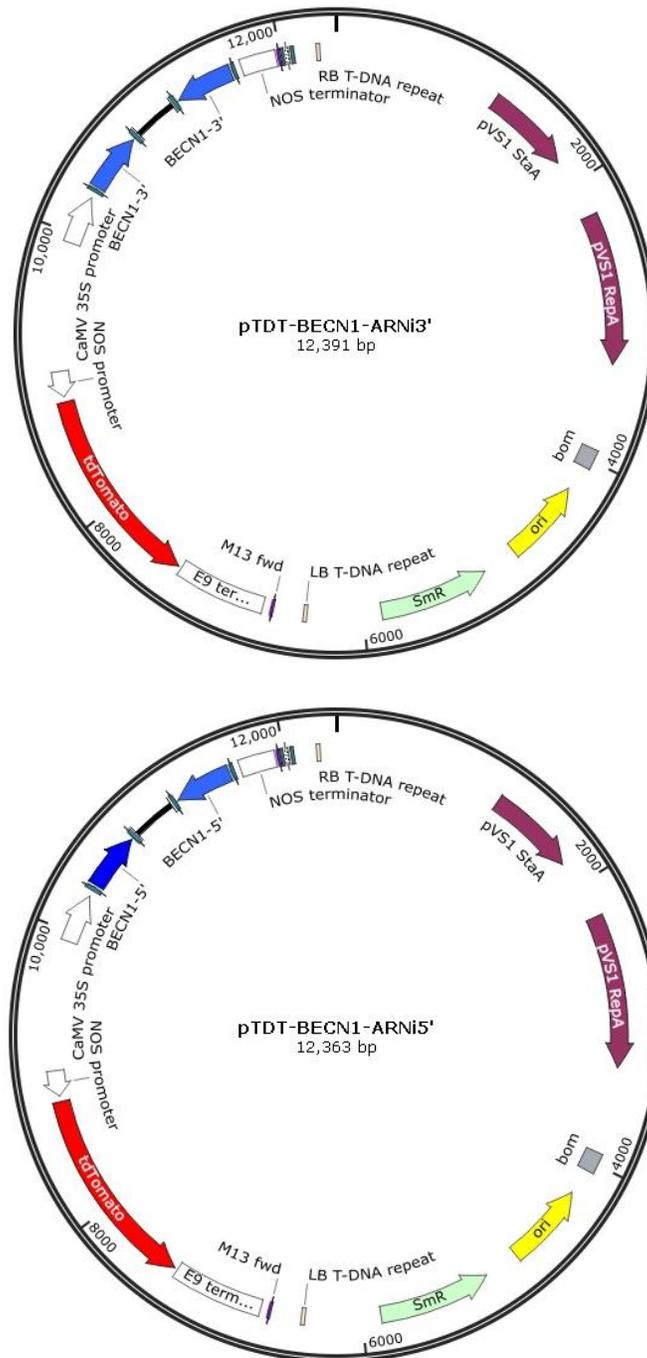


Figura Suplementaria III. Mapa de los vectores construidos para el silenciamiento de *PvBECN1*. Arriba se muestra mapa del vector pTDT-BECN1-ARNi3' y abajo el del vector pTDT-BECN1-ARNi5' construidos para dirigir la pérdida de función de *PvBECN1*. Ambos vectores presentan dos fragmentos del gen a silenciar en cada extremo del intrón WRKY de manera invertida para la formación de una estructura tallo-asa.