



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Análisis de la participación de FERONIA, un receptor tipo  
cinasa, en el desarrollo de los pelos radicales de frijol y en su  
asociación con rhizobia**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**IBQ Jorge Esaú Solís Miranda**

TUTOR PRINCIPAL

**M en I.B.B. María del Carmen Quinto Hernández (Tutor)**  
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Helena Porta Ducoing**  
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

**Dra. María del Rocío Cruz Ortega**  
(Instituto de Ecología, UNAM)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



ESTE PROYECTO SE LLEVÓ A CABO EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM, EN EL GRUPO DE LA DOCTORA **MARÍA DEL CARMEN QUINTO HERNÁNDEZ**, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS.

AGRADEZCO AL **CONACYT** POR EL APOYO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO: BECA **CONACYT**, NIVEL DE MAESTRÍA NÚMERO **384239**.

AGRADEZCO AL **PROGRAMA DE APOYO A LOS ESTUDIOS DE POSGRADO (PAEP)** POR EL APOYO PARA ASISTIR AL CONGRESO INTERNACIONAL “PLANT BIOLOGY 2016”, REALIZADO EN LA CIUDAD DE AUSTIN, TX, E.E. U.U., LOS DÍAS 9 AL 13 DE JULIO DEL 2016.

## **DEDICATORIA**

ESTE TRABAJO LO DEDICO A MIS PADRES, JAVIER E IRINA, Y A MIS HERMANOS, JAPER Y LELI, QUE SIEMPRE ME HAN MOSTRADO SU AMOR Y SU APOYO, Y CON EL CUAL ME DAN LA FUERZA Y LA CONFIANZA PARA ALCANZAR MIS METAS. NO TENGO PALABRAS PARA EXPRESAR LA GRATITUD QUE SIENTO HACIA USTEDES.

A LA DOCTORA CARMEN QUINTO, QUE ME DIO SU APOYO DESDE QUE DECIDÍ ENTRAR AL POSGRADO, PERMITIENDO FORMAR PARTE DE SU GRUPO DE TRABAJO, EN DONDE HA IDO CRECIENDO MI AMOR POR LA CIENCIA. EN USTED Y EN EL DOCTOR FEDERICO CONOCÍ A UNAS PERSONAS EXCEPCIONALES, QUE HAN MARCADO MI VIDA, Y SERÁN INOLVIDABLES.

AGRADEZCO A MIS COMPAÑEROS DEL GRUPO DE TRABAJO, CON QUIENES COMPARTÍ ESTOS AÑOS DE MI VIDA. AL DOCTOR MARCO JUAREZ, CUYA FORMA DE DISFRUTAR LA CIENCIA ES TOTALMENTE CONTAGIOSO, A NOREIDE QUE SIEMPRE ESTUVO AHÍ PARA RESOLVER CUALQUIER DUDA. A TODO EL RESTO DE LAS PERSONAS QUE HAN PISADO EL LABORATORIO DE LA DOCTORA CARMEN, REALMENTE HICIERON QUE CADA DÍA DE TRABAJO FUERA MÁS DIVERTIDO QUE EL ANTERIOR.

A LOS AMIGOS QUE HICE DURANTE LA MAESTRÍA, QUIENES COMPARTIERON CONMIGO LAS FRUSTRACIONES Y ÉXITOS DURANTE ESTOS POCO MÁS DE DOS AÑOS, SUS PALABRAS DE ALIENTO ME MOTIVARON A SEGUIR INTENTÁNDOLO, ASÍ COMO LO HICIERON USTEDES.

¡GRACIAS POR TODO!

## **AGRADECIMIENTOS**

AGRADEZCO A LOS TECNICOS, NOREIDE NAVA NUÑEZ Y OLIVIA SANTANA ESTRADA DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, ASÍ COMO AL TÉCNICO ALFONSO LEIJA DEL CENTRO DE CIENCIAS GEMÓMICAS; POR TODO SU APOYO TÉCNICO PARA LA REALIZACION DE ESTE PROYECTO.

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL, DOCTORA HELENA PORTA DUCOING Y DOCTORA MARIA DEL ROCIO CRUZ ORTEGA; POR SU APOYO CONSTANTE PARA CONSEGUIR LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO.

A LOS REVISORES DE LA TESIS Y MIEMBROS DEL JURADO, DOCTORA ESPERANZA MARTINEZ, DOCTOR FRANCISCO CAMPOS, DOCTORA GLADYS CASSAB, DOCTOR JOSEPH DUBROVSKY, Y DOCTOR MIGUEL ANGEL CEBALLOS; POR SUS ATENTAS OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES.

# I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	1
II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	3
1. RESUMEN.....	5
2. ABSTRACT .....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	7
3.1 EL FRIJOL.....	7
3.2 EL CRECIMIENTO POLAR.....	7
3.3 EL PROCESO DE LA SIMBIOSIS.....	8
3.4 FERONIA, UN RECEPTOR TIPO CINASA.....	12
3.5 LA REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE FERONIA.....	13
3.6 RALF, EL LIGANDO DE FERONIA.....	15
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. HIPÓTESIS.....	17
6. OBJETIVOS.....	17
7. METODOLOGÍA.....	18
7.1 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> .....	18
7.2 CUANTIFICACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS.....	19
7.3 CINÉTICAS DE LA ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS <i>PvFER1</i> Y <i>PvFER2</i> .....	19
7.4 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	20
7.5 GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES PARA RNAi Y SOBREENPRESION.....	20
7.6 GENERACIÓN DE PLANTAS DE FRIJOL CON RAÍCES TRANSGÉNICAS.....	21
7.7 CUANTIFICACIÓN DE NÓDULOS Y MEDICIÓN DE DIÁMETROS.....	21
7.8 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA.....	22
8. RESULTADOS.....	23
8.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	23
8.2 ANALISIS DE LA ACUMULACION DE TRANSCRITOS <i>PvFER1</i> Y <i>PvFER2</i> .....	26
8.3 CONSTRUCCIONES PARA LA SOBREENPRESION O EL SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>PvFER1</i> .....	30
8.4 ANÁLISIS DE LAS RAÍCES TRANSGENICAS SOBREENPRESANTES O SILENCIA- DAS EN <i>PvFER1</i> .....	31

8.5 ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE LAS RAICES TRANSGENICAS DE FRIJOL.....	34
8.5.1 NÚMERO DE NÓDULOS Y DIÁMETRO.....	34
8.5.2 REDUCCIÓN DE ACETILENO.....	39
9. DISCUSIÓN.....	41
10. CONCLUSIONES.....	46
11. BIBLIOGRAFÍA.....	47
12. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	53



## II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. RELACIÓN ENTRE LAS EOR Y EL Ca <sup>2+</sup> .....	8
FIGURA 2. CICLO DE LAS RHO GTPasas .....	9
FIGURA 3. PROCESO DE INFECCIÓN Y FORMACIÓN DE UN NÓDULO DETERMINADO .....	11
FIGURA 4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LOS DOMINIOS CARACTERÍSTICOS DE FERONIA .....	13
FIGURA 5. FENOTIPOS DE MUTANTES <i>fer</i> , <i>tun</i> , <i>evn</i> Y <i>llg1</i> DE ARABIDOPSIS .....	14
FIGURA 6. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LA FAMILIA DE RECEPTORES TIPO CINASA CrRLK1L .....	25
FIGURA 7. UBICACIÓN Y ALINEAMIENTO DE LOS GENES Phvul.008G081000.1 ( <i>PvFER1</i> ) Y Phvul.008G082400 ( <i>PvFER2</i> ) .....	26
FIGURA 8. MAPA DE CALOR QUE REPRESENTA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE FRIJOL COMÚN PERTENECIENTES A LA FAMILIA CrRLK1L EN DIFERENTES CONDICIONES .....	27
FIGURA 9. COMPARACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS <i>PvFER1</i> Y <i>PvFER2</i> .....	28
FIGURA 10. CINÉTICA DE ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES <i>PvFER1</i> Y <i>PvFER2</i> ...	29
FIGURA 11. VECTOR PARA LA SOBREENPRESIÓN DEL GEN <i>PvFER1</i> EN RAÍCES DE FRIJOL .....	31
FIGURA 12. VECTOR PARA EL SILENCIAMIENTO DE <i>PvFER1</i> EN RAÍCES DE FRIJOL .....	32
FIGURA 13. ACUMULACIÓN DE TRANSCRITO <i>PvFER1</i> EN RAÍCES TRANSGÉNICAS DE FRIJOL .....	33
FIGURA 14. NÚMERO DE NÓDULOS POR PLANTA Y DIÁMETRO DE NÓDULOS EN RAÍCES SOBREENPRESANTES DE <i>PvFER1</i> .....	35
FIGURA 15. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL EN EL DIÁMETRO DE NÓDULOS EN RAÍCES SOBREENPRESANTES EN <i>PvFER1</i> .....	37
FIGURA 16. NÚMERO DE NÓDULOS POR PLANTA Y DIÁMETRO DE NÓDULOS EN RAÍCES SILENCIADAS EN <i>PvFER1</i> .....	38
FIGURA 17. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL EN EL DIÁMETRO DE NÓDULOS EN RAÍCES SILENCIADAS EN <i>PvFER1</i> .....	39

<b>FIGURA 18. ANÁLISIS DE LA REDUCCIÓN DE ACETILENO EN RAÍCES TRANSGÉNICAS SILENCIADAS Y SOBREEXPRESANTES DE <i>PvFER1</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA S1. ALINEAMIENTO DE LOS DOMINIOS “MALECTINE-LIKE” DE <i>FER</i> DE <i>A. thaliana</i> Y <i>PvFER1</i> Y <i>PvFER2</i> DE <i>P. vulgaris</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>TABLA 1. OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LAS CONSTRUCCIONES PARA EL SILENCIAMIENTO Y LA SOBREEXPRESIÓN DE <i>PvFER1</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>TABLA 2. FAMILIA DE RECEPTORES TIPO CINASA CrRLK1L EN FRIJOL .....</b>	<b>24</b>
<b>TABLA S1. SOLUCIONES PARA MEDIO B&amp;D (Broughton and Dilworth, 1971) .....</b>	<b>54</b>
<b>TABLA S2. SOLUCIONES PARA FAHRAEUS (Vincent, 1970) .....</b>	<b>54</b>
<b>TABLA S3. SOLUCIONES PARA TINCION DE GUS (Lee and Schoffl, 1997) .....</b>	<b>55</b>

## 1. RESUMEN

FERONIA (FER) es un receptor de membrana tipo cinasa (RLK; por sus siglas en inglés Receptor Like Kinase) que se expresa prácticamente de manera constitutiva en todos los tejidos de las plantas, con excepción de los tubos polínicos. En *Arabidopsis thaliana*, FER participa en distintos procesos de señalización: como en la respuesta a hormonas como los brasinoesteroides (Guo *et al.*, 2009), el ácido abscísico (Yu *et al.*, 2012) y el etileno (Deslauriers and Larsen, 2010); en la recepción del tubo polínico en los gametofitos femeninos (Escobar-Restrepo, *et al.*, 2007); en la regulación del crecimiento polar de los pelos radicales (Duan *et al.*, 2010), entre otros.

El objetivo de este trabajo se enfocó en seleccionar el gen en frijol que codifican la proteína FER, y caracterizar la función de FER en raíces de frijol durante el proceso de simbiosis entre frijol y rhizobia mediante genética reversa. Realizamos una búsqueda por “blastp” de las secuencias en el genoma de frijol (PHYTOZOME) que presentan una alta identidad con FERONIA y posteriormente analizamos los dominios aminoacídicos presentes en estas secuencias. De esta forma identificamos a los miembros de la subfamilia de receptores CrRLK1L en frijol. Mediante un análisis filogenético, determinamos el clado de proteínas FERONIA y posteriormente seleccionamos dos genes de frijol (nombrados aquí *PvFER1* y *PvFER2*). A continuación, discriminamos entre ellas en base a sus perfiles de acumulación de transcrito en raíces de frijol inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT 899, y sin inocular, a distintos días post inoculación (dpi). *PvFER1* presentó mayor acumulación de transcrito y lo seleccionamos para su caracterización.

Para analizar la función de *PvFER1*, se generaron raíces transgénicas de frijol en las que, por genética reversa, se disminuyó o sobre-expresó el nivel de transcrito *PvFER1*. Evaluamos el fenotipo de las raíces transgénicas, encontrando que, en las raíces de frijol que sobreexpresan *PvFER1* hubo una mayor cantidad de nódulos con diámetros más pequeños cuando se comparan con el control; mientras que en el caso del silenciamiento de *PvFER1*, hubo una disminución en el número de nódulos generados, y estos tuvieron también diámetros menores a los de las raíces control. No observamos diferencia alguna en la actividad específica de la nitrogenasa, ni para la condición de sobreexpresión, ni en la condición del silenciamiento de *PvFER1*.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que *PvFER1* tiene un papel en el número de nódulos que se formaran y en su crecimiento.

## 2. ABSTRACT

FERONIA (FER) is a receptor like-kinase (RLK) that, except in the pollen tubes, expresses almost constitutively in all plant tissues. In *A. thaliana*, FER plays roles in different signaling processes, *e.g.*, in the responses to phytohormones like brassinosteroids (Guo *et al.*, 2009), abscisic acid (Yu *et al.*, 2012) and ethylene (Deslauriers and Larsen, 2010); in the pollen tube reception into the female gametophyte (Escobar-Restrepo, *et al.*, 2007); in the root hairs tip growth (Duan *et al.*, 2010), among others.

The main objective of this work was the selection of the gene that code for FER in *P. vulgaris*, and characterize its function in roots, through reverse genetics, during symbiosis between common bean and Rhizobia. We perform a bioinformatic search with a “blastp” in the PHYTOZOME database, looking-for sequences in common bean sharing high identity with FER from *A. thaliana*, followed by an aminoacidic domains presents on those sequences. From this analysis, we determine the members of the CrRLK1L subfamily present in common bean. Through phylogenetic assays, we determine the clade for FER proteins, and two genes of common bean were selected (named here as *PvFER1* y *PvFER2*). By a RT-qPCR, we discriminate between the two selected sequences based on its expression profile in common bean roots inoculated with *R. tropici*, and without inoculation, at several times points post inoculation (dpi). Because its higher expression, we decide to select *PvFER1* to functionally characterize it.

To analyze *PvFER1* function, we generate hairy roots in common bean, in which, through reverse genetics, the *PvFER1* transcription level was diminished or increased. The evaluation of these common bean transgenic roots showed us that, in *PvFER1* over-expressing roots, the number of nodules per plant increases but its diameters are lower compared to control common bean roots; while, in *PvFER1* silenced roots, the number of nodules per plant diminishes and, like in over-expressing ones, its diameters are lower compared to control roots. The levels of nitrogen fixation were not affected in both, over-expressing and silenced roots, when compared to control roots.

Results presented here suggests that FER plays a role in the number of nodules that are formed during symbiosis, and in their size.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1 El frijol**

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la especie de planta más conocida del género *Phaseolus* dentro de las leguminosas. Se sugiere que Mesoamérica es el centro de origen del frijol, y a partir de este se generaron dos acervos genéticos debido a la domesticación: el acervo Mesoamericano, desde México al norte de Ecuador; y el acervo Andino, desde el sur de Ecuador al Norte de Argentina (Schmutz *et al.* 2015). El frijol se distingue por ser altamente poliforme, ya que de acuerdo con las condiciones agroecológicas donde se desarrolla, pueden distinguirse variaciones fenológicas entre la misma especie de una región a otra. El género *Phaseolus* incluye aproximadamente 35 especies, de las cuales cuatro se cultivan: *P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*, y *P. acutifolius*. El frijol es una fuente importante de alimento debido a su alto valor proteico, sobre todo en países donde el ingreso per cápita limita la adquisición de alimento de alto valor proteico, como los cárnicos. Ocho de los países de América que consumen más frijol son Nicaragua, Brasil, México, Paraguay, Belice, Costa Rica, Guatemala y Honduras (Reyes *et al.* 2008).

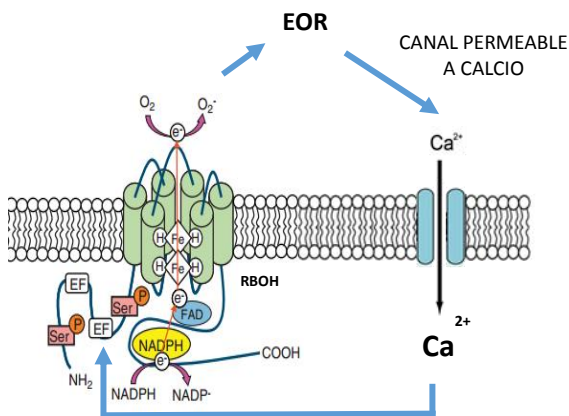
El frijol tiene además una gran importancia agroecológica; como miembro de la familia de las leguminosas posee la capacidad de asociarse con bacterias del suelo del género *Rhizobium*, lo que permite a dichas bacterias realizar la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. Esta interacción planta-bacteria es altamente específica. Una vez establecida la asociación simbiótica, la planta provee a la bacteria el carbono que requiere para sus funciones, y de un nicho con concentraciones bajas de oxígeno para que la fijación de nitrógeno ocurra.

#### **3.2 El crecimiento polar**

Los pelos radicales y los tubos polínicos son las células vegetales con crecimiento polar más estudiadas. Su elongación ocurre mediante la secreción de vesículas de manera polarizada hacia la región de crecimiento. Estas vesículas provienen de Golgi y llevan membrana y componentes de pared celular que se incorporan a la membrana plasmática y a la pared celular en crecimiento (Hepler, 1997; Mendrinna and Persson, 2015). El papel de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el crecimiento polar es vital. Se ha descrito que las concentraciones de calcio citosólico y extracelular en la punta de la región de crecimiento, oscilan en fase con el crecimiento polar, siendo la región apical la que presenta el mayor crecimiento, y es en donde se observa la mayor concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Gage, 2004; Cárdenas *et al.*, 2008). Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (EROs) son

compuestos que se ha descrito que participan de manera importante en varios procesos, por ejemplo, en respuesta a estrés biótico y abiótico, en la señalización hormonal y en el desarrollo de pelos radicales. Las EROs son necesarias para la elongación normal de los pelos radicales, ya que están relacionados con el establecimiento de los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático durante el crecimiento polar, a través de la apertura de los canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  (Gage, 2004; Cárdenas *et al.*, 2008).

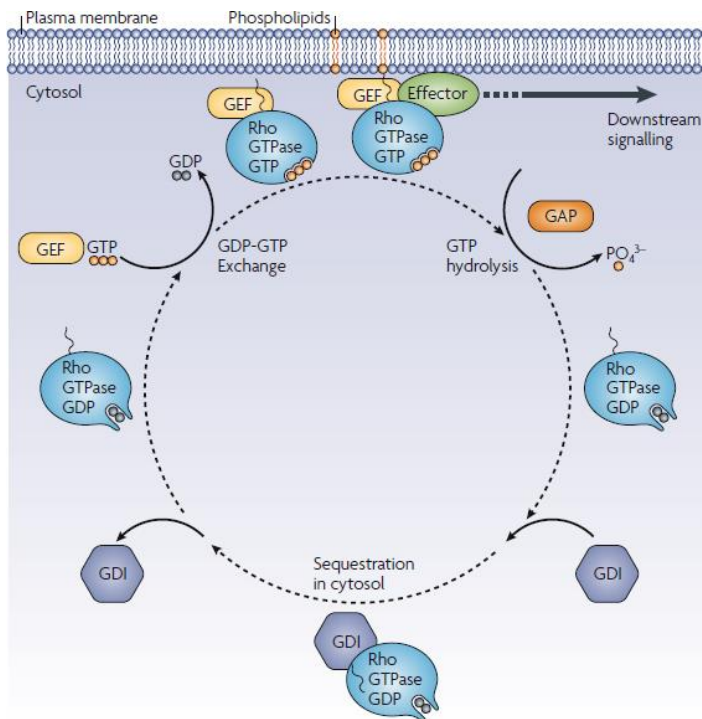
Una de las principales vías generadoras de EROs es la que catalizan las NADPH oxidasas (RBOHs en plantas por *Respiratory Burst Oxidase Homologs*). Estas enzimas, son proteínas transmembranales que reducen oxígeno para generar el ion superóxido usando NADPH como donador de electrones. Su actividad está regulada en la región amino terminal por motivos de unión a calcio (EF hands), por unión a pequeñas GTPasas (Wong *et al.*, 2007) o por fosforilación de residuos de serina (Kimura *et al.*, 2012) (Figura 1). La activación de estas enzimas promueve la reducción de una molécula de oxígeno a ion superóxido, una EOR altamente inestable que puede ser dismutada a peróxido de hidrógeno, que es otra EOR, por la superóxido dismutasa. Estos compuestos pueden interactuar con un canal de membrana permeable a calcio, estableciéndose un influjo de calcio hacia el citoplasma y facilitando así la elongación celular (Figura 1).



**Figura 1. Relación entre las EOR y el  $\text{Ca}^{2+}$ .** Las NADPH oxidasas (RBOHs en plantas) son las principales fuentes productoras de EOR. Estas EOR interactúan con canales de membrana permeables a calcio, a través de los cuales hay influjos de este ion al citoplasma celular. Este calcio citoplasmático puede unirse a dominios de unión a calcio "EF hands" en la región amino terminal de la oxidasa, regulando su actividad (Modificado de Suzuki *et al.* 2011).

Corriente arriba de la actividad de estas RBOHs durante el crecimiento polar, se ha descrito la participación de GTPasas pequeñas parecidas a Rho (RAC/ROP) y que regulan la acumulación de EOR originadas por estas oxidasas (Jones *et al.*, 2007). Las proteínas RAC/ROP, son una familia de proteínas que se unen a GTP/GDP, que participan en procesos relacionados al crecimiento, desarrollo y adaptación a diversas condiciones ambientales (Gilroy *et al.*, 2014). Como miembros de la superfamilia Ras poseen regiones conservadas de unión a GTP/GDP y de hidrólisis de GTP.

Estas GTPasas actúan como “switches” moleculares a través de ciclos de unión a GDP y GTP, los cuales provocan cambios de estados: activos (la GTPasa normalmente unida a GTP y anclada en la membrana) e inactivos (la GTPasa unida a GDP y libre en el citoplasma) (Iden and Collard, 2008, Figura 2). Trabajos previos de RAC/ROP durante el crecimiento polar de pelos radicales en *A. thaliana*, han revelado que su expresión constitutiva genera la deslocalización de los gradientes de  $Ca^{2+}$  de la zona apical del pelo radical hacia el resto de la célula, induciéndose un crecimiento isotrópico (Molendijk et al., 2001).



**Figura 2. Ciclo de las Rho GTPasas.** Las GTPasas de la familia Rho actúan como “switches” moleculares, realizando ciclos activos (unidas a GTP y asociadas a membrana) e inactivos (unidas a GDP y libre en el citoplasma). La regulación espacio-temporal de la actividad de las GTPasas tiene lugar en tres niveles: el intercambio de GDP por GTP, el cual se estimula por un intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF); la hidrólisis de GTP, llevada a cabo por la GTPasa pero se ve incrementada por su unión con una proteína activadora de GTPasas (GAP); y la inhibición de la disociación de GDP, catalizada por el inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI), evita la asociación de la GTPasa a la membrana al ocultar los motivos en la región carboxilo terminal necesarios para esta asociación (Iden and Collard, 2008).

La simbiosis entre leguminosas y bacterias, es un proceso que ocurre principalmente en los pelos radicales de las raíces de la planta, y han sido descritas mecanismos que actúan tanto en el crecimiento polar de estas células, así como durante la interacción planta-bacteria; como es el caso de la producción de EOR por NADPH oxidasas (Foreman *et al.*, 2003; Montiel *et al.*, 2012), la apertura de canales permeables a  $Ca^{2+}$  (Cárdenas *et al.* 2000; Gage, 2004). Debido a esto, se piensa que muchos de los mecanismos de crecimiento polar también pueden estar participando en el establecimiento de la simbiosis.

### 3.3 El proceso de la simbiosis

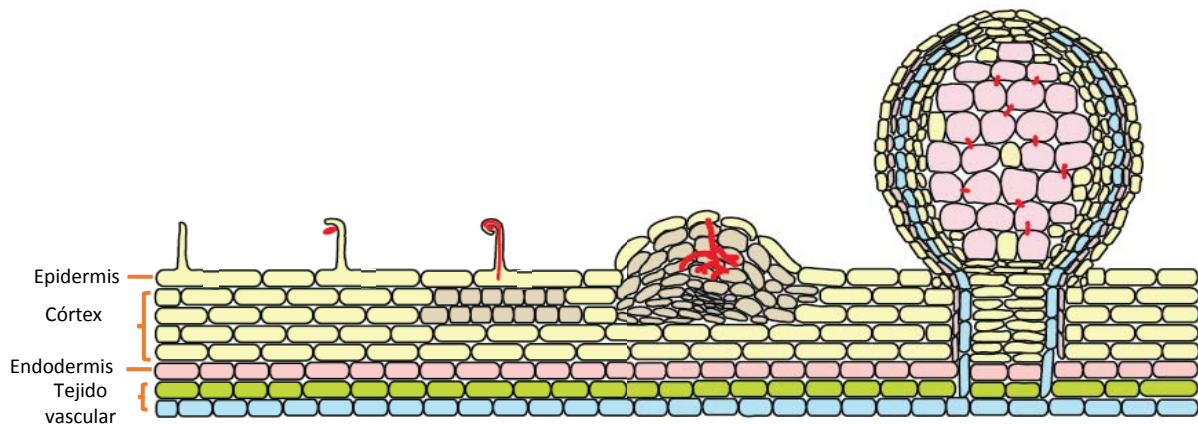
El proceso simbiótico, que se establece entre las raíces de las leguminosas y las bacterias del suelo del género *Rhizobium*, inicia con un diálogo molecular entre el macro y el microsimbionte, en el

cual las raíces del hospedero producen, entre muchos otros compuestos, “moléculas señales” llamadas flavonoides. Estas sustancias también funcionan como quimio-atractivos específicos de las bacterias hacia el ápice de los pelos radicales, e inducen junto con NodD (un activador transcripcional bacteriano) la transcripción de los genes de nodulación de rhizobia (genes *nod*). La expresión de estos genes a su vez conduce a la síntesis y secreción de los llamados Factores de nodulación (FN), que son lipoquitos-oligosacáridos específicos con modificaciones químicas en sus extremos reductor y no reductor. Estos FNs se perciben específicamente por receptores ubicados en el ápice de los pelos radicales de las leguminosas, que a concentraciones pico y nanomolares desencadenan una serie de respuestas que van desde incrementos en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  en la región del ápice de los pelos radicales, hasta el redireccionamiento del crecimiento polar (Gage, 2004). No todos los pelos radicales que se encuentran en una raíz durante el establecimiento de simbiosis son infectados; los más susceptibles son aquellos que se encuentran cerca de completar su crecimiento, en los cuales los mecanismos de crecimiento polar están activos. Esto sugiere que algunos mecanismos que participan en el desarrollo normal de los pelos radicales, específicamente aquellos relacionados con el crecimiento polarizado, pudieran estar involucrados en el proceso de la infección.

La entrada de las bacterias al córtex de la raíz ocurre a través del hilo de infección (“infection thread”, IT), una estructura tubular que se genera por la invaginación de la pared celular y la membrana del pelo radical, y por tanto, el IT está compuesto por materiales similares a los de la pared celular del pelo radical (pectina, xiloglucanos y celulosa) (Rae et al. 1992); las bacterias que se internalizan a través de esta estructura se encuentran topológicamente fuera del pelo radical (Gage, 2004). El IT migra hacia el interior del pelo radical, guiado por el núcleo del pelo, hasta internalizarse en las células del córtex (Patriarca et al. 2004). Simultáneamente a este proceso de migración, se induce la desdiferenciación de las células del córtex de la raíz, reactivando procesos de división celular, que conllevan a la formación del primordio del nódulo (Ferguson et al. 2010). Una vez que el IT alcanza el córtex, se ramifica y libera las bacterias al interior de algunas células del primordio del nódulo (Figura 3), por un proceso parecido a la endocitosis (Udvardi and Day, 1997). Tras la internalización de las bacterias, éstas quedan envueltas con una membrana vegetal, llamada membrana peribacteroidal, que las protege de los mecanismos de defensa de las células vegetales (Udvardi and Day, 1997). Finalmente, las bacterias se diferencian a bacteroides, y es en



este estado que se lleva a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio (Patriarca et al. 2004).



**Figura 3. Proceso de infección y formación de un nódulo determinado.** Durante el proceso de formación de un nódulo determinado en raíces de leguminosas, la bacteria ingresa al pelo radical a través del hilo de infección (IT, en rojo), el cual migra hasta las células del córtex donde se forma el primordio del nódulo (en café). Una vez en este lugar el IT se ramifica y vacía las bacterias al interior de las células del primordio del nódulo en un proceso parecido a endocitosis. Una vez dentro, las bacterias se diferencian a bacteroides. El nódulo madura aproximadamente 15 días después de que inicia la infección; las células rosadas dentro del nódulo representan células infectadas en las cuales se está llevando a cabo la fijación de nitrógeno (Modificado de Popp and Ott, 2011).

Al igual que en el desarrollo de los pelos radicales, el  $\text{Ca}^{+2}$  se ha descrito como uno de los principales participantes en las respuestas tempranas a los FN. Se han reportado incrementos en los inlfujos de  $\text{Ca}^{+2}$  de hasta 4 veces comparado con niveles basales, dentro de los 5 a 10 minutos posteriores a la aplicación de los FN (Cárdenas *et al.*, 2000). Posteriormente se ha descrito que hay oscilaciones de dicho ion en la región perinuclear (10 a 15 minutos después), este proceso es vital para que ocurra la expresión de genes inducidos por los FNs, así como la despolarización de la membrana (Cárdenas *et al.* 2000). También, Cárdenas *et al.* (2008) reportaron que hay un incremento rápido y transiente de las concentraciones de EOR en el ápice de los pelos radicales de frijol segundos después del tratamiento con los FNs. En base a estos resultados, se propuso que los patrones de oscilaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  se correlacionan con oscilaciones en las concentraciones de EOR, sugiriendo que están estrechamente relacionados, y que ambos participan en las etapas tempranas en respuesta a los FNs (Cárdenas *et al.* 2008). Por otro lado, se ha reportado que la producción de EOR por RHD2 (root hair defective 2), una NADPH oxidasa, conduce a la estimulación de canales permeables a  $\text{Ca}^{+2}$ , y llevando al crecimiento polar (Foreman *et al.*, 2003). En nuestro grupo de trabajo, hemos descrito en frijol nueve genes que codifican NADPH oxidasas, llamadas *PvRboA – PvRboI*. De éstas, cuatro (*PvRboA – PvRboD*) tienen una elevada acumulación de transcrito en pelos radicales y raíces (Montiel, 2012). De acuerdo a nuestros resultados,

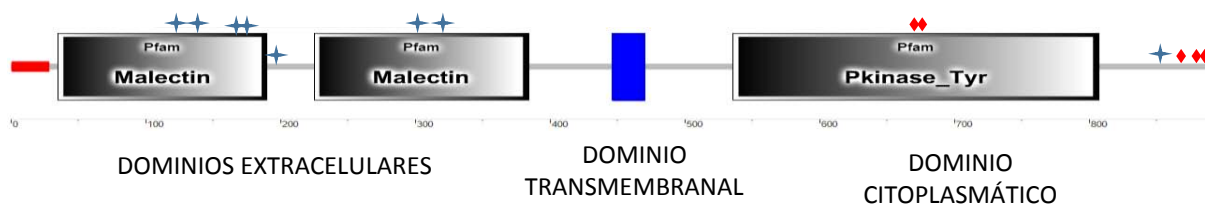
*PvRbohA* y *PvRbohB* tienen un papel esencial en la nodulación en frijol (Montiel, 2012; Arthikala *et al.*, 2014; y trabajo en proceso). A su vez Duan *et al.*, demostraron la participación del receptor tipo cinasa FERONIA (FER), en la activación de NADPH oxidasas durante el crecimiento polar en pelos radicales (Duan *et al.*, 2010), abriendo la posibilidad de que la activación de algunas NADPH oxidasas durante el proceso de simbiosis esté llevándose a cabo a través de un receptor tipo cinasa como FER.

### **3.4 FERONIA, un receptor tipo cinasa de membrana**

FER es un receptor de membrana (RLK), de la subfamilia CrRLK1L, nombradas así debido a que el primero de sus miembros fue identificado y caracterizado en *Catharanthus roseus*. Esta familia se caracteriza por la presencia de dos dominios extracelulares de unión a carbohidratos parecidos a la proteína animal malectina (Malectin-Like, Figura 4). Además de FER, se han descrito otras proteínas de la familia CrRLK1L, entre ellas se encuentran las llamadas ANXUR 1 y 2 (ANX1/ANX2), HERKULES (HERK), y THESEUS (THE). ANX1/ANX2 que se expresan específicamente en tubos polínicos. Las dobles mutantes *anx1/anx2* generan infertilidad debido al rompimiento prematuro de los tubos polínicos durante la fertilización, (Boisson-Dernier *et al.*, 2009, Boisson-Dernier *et al.*, 2011); THE se ha identificado como posible detector de daño de pared celular y se ha reportado que en *A. thaliana*, al inhibirse la síntesis de celulosa, las mutantes *the* muestran una respuesta de defensa menor que la que ocurre en las plantas de tipo silvestre (Hematy *et al.*, 2007). Se ha descrito que HERK tiene un papel en el desarrollo y en el crecimiento de brotes en esta misma planta modelo (Guo *et al.* 2009).

Inicialmente, FER se identificó como regulador de la fertilidad femenina en plantas, en donde se reportó su participación durante el crecimiento de los tubos polínicos (Escobar-Restrepo *et al.*, 2007). FER se transcribe en todos los tejidos vegetales con excepción de los tubos polínicos; su acumulación es elevada en regiones donde ocurre elongación celular, y ésta es inducida por las auxinas, los brasinoesteroides (BR) y el etileno, pero reprimida por ácido abscísico (Guo *et al.*, 2009; Deslauriers and Larsen, 2010; Yu *et al.*, 2012) FER presenta una distribución uniforme en la mayoría de los tejidos vegetales, sin embargo, la disponibilidad y concentración de sus ligandos, y la interacción con sus correceptores, inducen una respuesta asimétrica y localizada (Li and Zhang, 2014, Li *et al.*, 2015,).

En *A. thaliana* se ha descrito el papel de FER en varios procesos; además de su participación en fertilización, se ha reportado que la función de FER es clave en la regulación de la elongación de hipocotilos mediado por BR (Figura 5A, Guo *et al.*, 2009), y que estas respuestas a BR dependientes de FER antagonizan los efectos del etileno en plantas etioladas, lo que sugiere que FER regula el balance entre las respuestas a ambas fitohormonas (Deslauriers and Larsen, 2010). Las mutantes *fer* en *A. thaliana* además muestran un fenotipo resistente a invasión fúngica, lo que sugiere la participación de FER en los procesos de infección (Figura 5B, Kessler *et al.*, 2010). Recientemente se describió la interacción de FER con la enzima citosólica gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, que cataliza una reacción de glucólisis, clave para la producción de energía; de esta forma FER está implicada en la regulación de la concentración de almidón (Yang *et al.*, 2015).

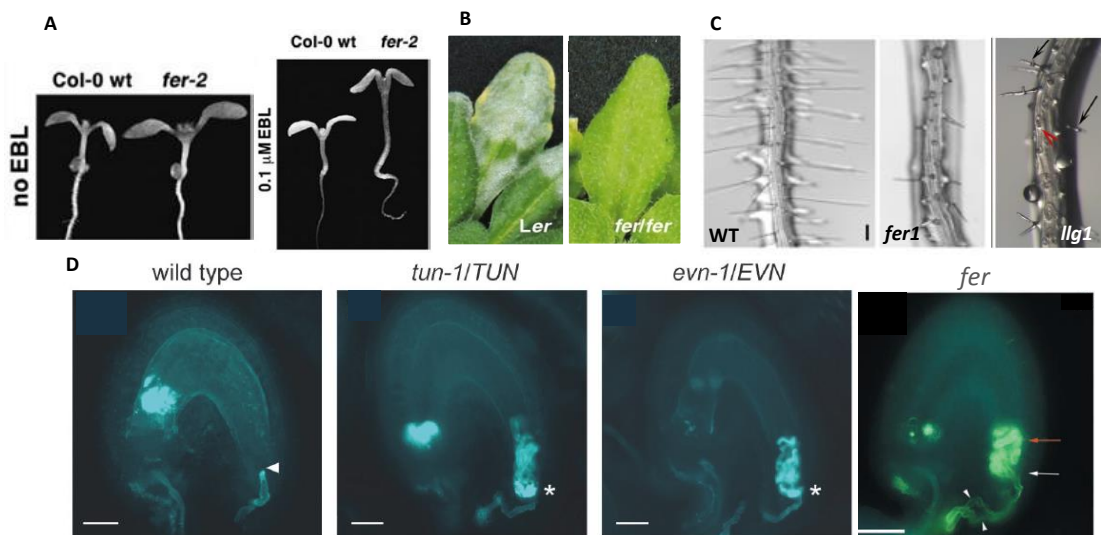


**Figura 4. Esquema representativo de los dominios característicos de FERONIA.** FERONIA es una proteína de membrana, perteneciente a las CrRLK1L. Presenta un único dominio transmembranal, en la región amino terminal presenta dos dominios extracelulares de unión a malectina y en la región carboxilo terminal un dominio citoplasmático de tirosina cinasa. Las estrellas azules muestran 8 sitios probables de N-glicosilación (N122, N140, N169, N177, N217, N303, N328, N858) predichos mediante el programa NetPhos 3.1 (sólo se muestran los sitios significativos). Los rombos rojos muestran los sitios de fosforilación descritos previamente por Nuhse *et al.* en 2004 (pS673, pS689) y por Haruta *et al.* en 2014 (pS858, pS871, pS874) (Modelo generado en el recurso bioinformático SMART, Schultz *et al.*, 1998).

Mutantes *fer* en *A. thaliana* presentan baja acumulación de RAC/ROP activos y una disminución en la producción de EOR dependiente de una NADPH oxidasa (Li and Zhang, 2014), lo que permite ubicar a FER corriente arriba en la cascada de producción de EOR a partir de NADPHs. En los pelos radicales, se ha descrito la participación de FER en el crecimiento y en el desarrollo de dichos pelos; las mutaciones en la secuencia codificante de FER conllevan a la ausencia de pelos radicales y a la formación de raíces cortas, esto se debe a que FER interactúa con factores intercambiadores de nucleótidos de Guanina (GEFs), y a través de estos modula la señalización de RAC/ROPs (Duan *et al.* 2010). Al no poder activarse la GTPasa, se detiene el crecimiento polar. FER funciona como receptor del péptido señal RALF 1 (Rapid Alkalinization Factor 1) que desencadena la alcalinización del medio y finalmente el arresto del crecimiento de los pelos radicales a través de la inhibición de una ATPasa de la membrana plasmática (Haruta *et al.*, 2014).

### 3.5 Regulación de la función de FER

La fosforilación/desfosforilación, es un sistema de regulación muy importante para modular la actividad de diversas proteínas, procesos que llevan a cabo algunas cinasas y fosfatasas, respectivamente. En el caso de FER, se ha determinado *in vitro* que el dominio cinasa tiene actividad y que además es capaz de autofosforilarse (Linder *et al.*, 2012). Mediante un análisis de fosfoproteómica, Nuhse *et al.*, (2004) reportaron que FER posee dos sitios de fosforilación, los cuales se ubican en el dominio cinasa (pS673, pS689; Figura 4), y que además el residuo pS689 se comparte entre 11 de los 17 miembros de la familia de CrRLK1L reportadas en *A. thaliana*, a la cual pertenece FER. A su vez, Haruta *et al.*, (2014) reportaron la fosforilación *in vitro* de FER al interactuar con su ligando RALF (se describe más abajo) en tres residuos de serina (pS858, pS871, pS874) en la región carboxilo terminal, en sitios distintos a los reportados previamente.



**Figura 5. Fenotipos de mutantes *fer*, *tun*, *evn* y *llg1* de Arabidopsis.** Se muestran algunos fenotipos descritos de *fer*, *tun*, *evn* y *llg1* en Arabidopsis. A) Las mutantes *fer-2* presentan un aumento en la respuesta a BR en plantas etioladas de 7 días, generándose plantas con hipocotilos más largos comparados con plantas WT (Guo *et al.*, 2009). B) Las mutantes homocigotas *fer/fer* son tolerantes a infección por el hongo del oídio (Powdery mildew, Kesslet *et al.*, 2010). C) Las raíces de mutantes *fer* presentan pelos radicales cortos, estallados y detenidos en el crecimiento respecto a la planta wild type. La mutante en el gen *llg1* que codifica para una proteína de unión a glicosilfosfatidilinositol presenta un fenotipo parecido a *fer*, la flecha señala un pelo radical estallado (Li *et al.*, 2015). D) fenotipos observados en gametofitos mutantes de *tun*, *evn* y *fer* durante el proceso de fecundación por tubos polínicos. Los tres fenotipos presentan crecimiento de los tubos polínicos dentro del gametofito femenino ya que estos no estallan al entrar al mismo. La cabeza de flecha muestra un tubo polínico que ha dejado de crecer, los asteriscos y la flecha blanca representan el punto donde el tubo polínico se detuvo en los óvulos wt, la flecha roja marca el tubo polínico que continuó creciendo en óvulos mutantes *fer*.

La glucosilación de proteínas, es un proceso de adición de carbohidratos a proteínas llevado a cabo en el retículo endoplasmático (RE); este tipo de modificación postraduccional es común en proteínas de la membrana plasmática y en las proteínas de secreción. Las N-glucosilaciones

comienzan en el retículo endoplasmático y sufren cambios al avanzar por el aparato de Golgi, mientras que las O-glucosilaciones ocurren exclusivamente en Golgi (Spyro, 2002; Aebi, 2013). Estas modificaciones tienen un papel en la localización subcelular de dichas proteínas, en su plegamiento correcto, estabilidad de la proteína al protegerla de la actividad de las proteasas y en el caso de proteínas de membrana para reconocer ligandos u otros interactores (Shental-Bechor and Levy, 2008). Durante su síntesis, FER se importa al RE donde se modifica con la adición de N-glucanos. Mediante un análisis de sitios probables de N-glucosilación, se determinó que en FER existen 8 residuos de asparagina susceptibles de ser N-glucosilados de acuerdo al programa NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 2004) (Figura 4). Recientemente se ha asociado la actividad de dos proteínas que participan en el proceso de N-glucosilación con la modificación de FER en retículo endoplasmático: TURAN (TUN) es un gen que codifica para una uridina difosfato (UDP)-glucosiltransferasa, y EVAN (EVN) codifica para una dolicol cinasa (Linder *et al.*, 2015). Las mutantes en estos genes en tubos polínicos muestran un fenotipo parecido a *fer*, esto es, un crecimiento excesivo de los tubos polínicos en el gametofito femenino sin que ocurra la ruptura de estos (Figura 5D, Linder *et al.*, 2015). Esto implica que las modificaciones postraduccionales en FER llevadas a cabo por TUN y EVN, son importantes para el funcionamiento correcto de FER en la fertilización (Linder *et al.*, 2015).

Li *et al.* (2015) han descrito que para la localización de FER en la membrana plasmática en *A. thaliana*, esta requiere interactuar con las proteínas de unión a glucosilfosfatidilinositol (GPI-AP, por *Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein*), LORELEI (LRE) en gametofitos y la proteína LLG1 (LRE-like GPI-AP1) en tejido vegetativo. Las raíces mutantes *llg1* de *A. thaliana* presentan un fenotipo parecido al que se observa en mutantes *fer* (Figura 5C), esto les permite sugerir la participación de LLG1 en la vía de señalización de FER en *A. thaliana* (Li *et al.* 2015). LLG1 y LRE interactúan con FER a través del dominio extracelular juxtamembranal de FER en RE, y dicha interacción es requisito para la localización de FER en la membrana plasmática (Li *et al.*, 2015). Li *et al.* proponen que dicha interacción se mantiene en la membrana plasmática, y es necesaria para que ocurra la señalización mediada por FER.

### **3.6 RALF, el ligando de FERONIA**

RALF es un péptido de secreción de 5 kDa y se describió en ensayos en los cuales se buscaron péptidos que indujeron un aumento de pH en el medio de cultivo, (Pearce *et al.* 2001). En los

péptidos que pertenecen a la familia de RALF, se ha descrito la presencia de un motivo de arginina-arginina (RR) altamente conservado, el cual es un sitio reconocido por la enzima proteolítica de “sitio 1” (AtS1P, Pearce *et al.* 2001). Los péptidos RALF están constituidos por un péptido maduro de aproximadamente 50 aminoácidos, con una región C terminal altamente conservada, además de 4 residuos de cisteína igualmente conservados, a través de los cuales se forman puentes disulfuro, necesarios para la estructura terciaria del péptido (Pearce *et al.* 2001). La enzima que cataliza la maduración de estos péptidos, AtS1P, se localiza en Golgi, por tanto, es probable que los péptidos RALF se procesen durante su trayecto en la vía de secreción. Su mecanismo de acción es a través de la unión con algún receptor de membrana, promoviendo la autofosforilación de este receptor. RALF Se expresa principalmente en raíces en *A. thaliana* (Haruta *et al.*, 2014); en la raíz principal, se ha descrito que RALF se une a FER e inicia una cascada de fosforilación que inhibe la actividad de la ATPasa de protones en la membrana plasmática (AHA2), y de esta forma se induce el incremento en el pH del aploplasto, evitando la elongación celular de la raíz (Haruta *et al.*, 2014). En *Medicago truncatula* se ha reportado que los niveles de *MtRALF1* aumentaron en respuesta a tratamiento con FN, sin embargo, la sobreexpresión de *MtRALF1* provoca una disminución en el número de nódulos, muchos de los cuales no son funcionales, pero no existe una alteración en la formación ni el desarrollo de las raíces primarias (Combiere *et al.*, 2008).

Con base en los antecedentes aquí presentados, en este trabajo nos propusimos a analizar informática y funcionalmente el gen que codifica la proteína FERONIA en frijol, cuyo transcrito se acumula a mayor nivel en pelos radicales tanto en condiciones de inoculación con rhizobia como sin inocular.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El análisis de la participación de FERONIA (FER) en los procesos de crecimiento polar de pelos radicales de frijol y en la nodulación con rhizobia, es de sumo interés ya que generará conocimiento de frontera y nos permitirá entender la integración de las señales que participan en ambos procesos.

#### 5. HIPÓTESIS

El silenciamiento y la sobreexpresión del gen que codifica la proteína FER en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* altera el desarrollo de los pelos radicales y el proceso de nodulación.

#### 6. OBJETIVOS

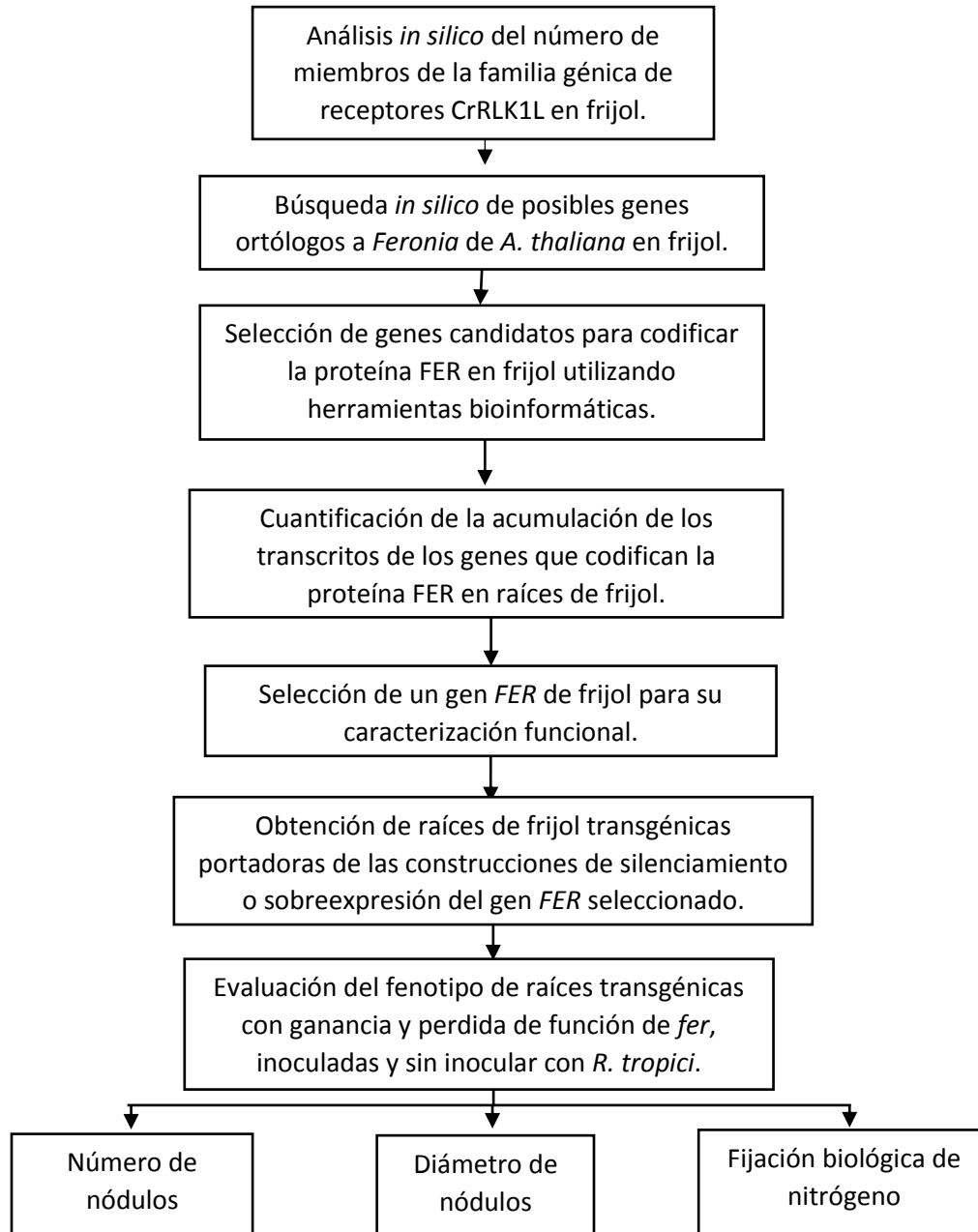
a. General.

Caracterizar el papel de *Feronia* en frijol por ganancia y pérdida de función en el crecimiento de los pelos radicales y en la nodulación.

b. Particulares

- i. Determinar el número de miembros de la familia de receptores CrRLK1L en frijol.
- ii. Seleccionar aquel gen o genes de *Feronia* en frijol, cuyo porcentaje de identidad con *Feronia* de *A. thaliana* sea el más alto.
- iii. Analizar la acumulación de los transcritos de los genes seleccionados en ii, en pelos radicales y en nódulos mediante RT-qPCR. Seleccionar el gen con mayor nivel de acumulación de transcrito para su caracterización funcional.
- iv. Empleando la metodología de RNAi, generar raíces transgénicas en frijol silenciadas en el gen *PvFER*, seleccionado en el paso anterior. Demostrar por RT-qPCR la disminución en la acumulación de transcrito y evaluar el fenotipo de estas raíces transgénicas en la nodulación.
- v. Generar raíces transgénicas en frijol que sobreexpresen *PvFER* seleccionado en iii. Demostrar por RT-qPCR el incremento en la acumulación de transcrito y evaluar el fenotipo de estas raíces transgénicas en la nodulación.

## 7. METODOLOGIA



### 7.1 Análisis *in silico*.

Con la finalidad de identificar las proteínas pertenecientes a la subfamilia CrRLK1L en frijol, e identificar la secuencia que corresponde a FERONIA, se realizó la búsqueda de la secuencia de aminoácidos de FERONIA de *A. thaliana* (AT3G51550); para esto se utilizó el recurso TAIR (The Arabidopsis Information Resource), que posee una base de datos de la genética y la biología



molecular de la planta modelo *A. thaliana*. A continuación, se realizó la búsqueda de homólogos de AT3G51550 en frijol empleando la secuencia proteica como “query” en la base de datos PHYTOZOME v11 (Goodstein *et al.*, 2012). Para realizar la construcción de un árbol filogenético se hizo uso del recurso bioinformático Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2010), de acuerdo a lo siguiente: primero se hizo un alineamiento múltiple mediante MUSCLE (Li *et al.*, 2015), después una curación del alineamiento mediante GBLOCKS (Castresana, 2000; Talavera and Castresana, 2007), y finalmente se hizo la construcción del árbol por máxima probabilidad usando PhyML (Guindon *et al.*, 2010). En este análisis filogenético se emplearon secuencias de distintas CrRLK1L de *A. thaliana* (17), *P. vulgaris* (34), *Glicine max* (46) y *M. truncatula* (36).

## **7.2 Cuantificación de la acumulación de transcrito**

Para llevar a cabo el análisis de la acumulación del transcrito del gen de interés, primeramente, se preparó el material biológico. Se germinaron 300 semillas de frijol negro Jamapa en medio nutritivo B&D (Tabla S1, Broughton and Dilworth, 1971); de éstas se eligieron 200 después de 2 días de germinación (dpg) para extraer RNA a partir de pelos radicales, ápice de raíz y raíz rasurada. 10 semillas se trasplantaron en macetas con vermiculita como sustrato y se inocularon con *R. tropici* CIAT 899. Se extrajo RNA de 15 días post inoculación (dpi) de tallos, hojas y raíces. Como control negativo se utilizó RNA de plantas sin inocular con el mismo tiempo de germinación (17 dpg). La extracción del RNA se hizo mediante el protocolo de extracción de RNA en un solo paso con TRIZOL de “Invitrogene” (Modificado de Chomczynski and Sacchi, 1987). La cuantificación se llevó a cabo mediante RT-qPCR usando el termociclador LightCycler Nano Instrument de Roche. Como referencia se empleó el transcrito del factor de elongación (EF1 $\alpha$ ), ya que este presenta expresión constitutiva.

## **7.3 Cinética de acumulación de los transcritos *PvFER1* y *PvFER2***

Con el objetivo de llevar a cabo la cinética de acumulación de los transcritos *PvFER1* y *PvFER2* se usaron 20 plántulas de 2 dpg y se inocularon con *R. tropici* CIAT 899; también se usaron 20 plántulas de 2 dpg sin inocular. De todas estas se extrajo el RNA de 5 plantas para cada uno de los tratamientos (3 dpi, 5, 7 y 9 dpi) y los días correspondientes para las plantas sin inocular (5, 7, 9, 11 dpg). A partir de este material se evaluó el patrón de acumulación de los transcritos *PvFER1* y *PvFER2* en raíces de frijol en ambas condiciones, nuevamente mediante RT-qPCR y empleando el factor de elongación como gen de referencia.

## 7.4 Diseño de oligonucleótidos

Para realizar la cuantificación de la acumulación de los transcritos *PvFER1* y *PvFER2* en las raíces de frijol sometidas a distintas condiciones, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada secuencia nucleotídica (Tabla 1). Para esto se realizó un alineamiento de las secuencias nucleotídicas que corresponden a cada transcrito y se ubicaron regiones con baja identidad entre ellas, esto para evitar que amplifiquen ambos transcritos. Para este fin se hizo uso de los recursos bioinformáticos DNAMAN 8 y SnapGene 2.1.

Del mismo modo, se diseñaron los oligonucleótidos para la generación de las construcciones de RNAi y de sobreexpresión del *PvFER1*. Los primeros se ubicaron en la región no traducida 5', una región poco conservada respecto a *PvFER2*. Como la clonación de estos fragmentos se realizó a través del vector de clonación dirigida pENTR Directional TOPO de Invitrogene, al inicio del oligonucleótido directo se adicionó la secuencia de 4 bases CACC, especificada por el fabricante. En el caso de los oligonucleótidos para la construcción de sobreexpresión, se ubicaron desde la primera base de la región traducida hasta la última base de dicha región, y nuevamente teniendo el cuidado de que sean específicos para *PvFER1*. En este caso se hizo uso una vez más de los recursos bioinformáticos DNAMAN 8 y SnapGene 2.1.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos para las construcciones para el silenciamiento y la sobreexpresión de *PvFER1*

OLIGOS	F	R
<i>Pv8081</i>	TTTGCTGCGTCCCATCGT	GCATAACTTCCTGTTGTGTTGGTC
<i>Pv8082</i>	TCCATTTTGTGAGGTATCATCA	CCAGGCAATAACATCAGCCTC
<i>PvFER1oex</i>	CACCATGTGGAGCATGAATCG	ACGCCCTTTTGGATTCATGATC
<i>PvFER1i5'</i>	CACCATCCTCACCTTTATTAGA	AATTACAATCACGCACACCCA
<i>PvFER2i3'</i>	CACCTTGGCTAGTGAAGACT	TACAGAATTTGAGTGGTTGACT

## 7.5 Generación de las construcciones de RNAi y de sobreexpresión

Para la generación de las construcciones de RNAi y de sobreexpresión de *PvFER1*, se utilizó primero el vector de clonación pENTR DIRECTIONAL TOPO, para clonar con la dirección adecuada tanto los fragmentos generados con los oligonucleótidos para RNAi como para la sobreexpresión de *PvFER1*. Estas construcciones en pENTR a continuación se recombinan en un vector de lanzadera pH7fwg2d (Karimi *et al.*, 2002) para la sobreexpresión de *PvFER1*, y el vector

ptdT-RNAi (Valdés-López, 2008) para su silenciamiento, basados en la tecnología Gateway de “Invitrogene”, empleando la enzima LR clonasa.

### **7.6 Generación de plantas de frijol con raíces transgénicas**

Con el fin de obtener raíces sobreexpresante o silenciadas en la expresión de *PvFER1*, se generaron plantas de frijol con raíces transgénicas portadoras de una de las dos construcciones, así como raíces transgénicas con los vectores control. La metodología empleada para la generación de raíces transgénicas está basada en el protocolo de Estrada-Navarrete *et al.*, 2007. Primero se germinaron semillas de frijol sobre servitoallas humedecidas con medio Fahraeus (Tabla S2, Vincent, 1970) y se incubaron a 28 °C durante 48 horas. A los dos días post germinación se inocularon con las clonas de *A. rhizogenes* K599 portadoras de las construcciones de sobreexpresión o silenciamiento, así como los respectivos controles. Las plantas se mantuvieron en medio Fahraeus estéril sin nitrógeno (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). A los 10 días se cortaron las raíces WT y las raíces transgénicas no fluorescentes (debido a que aun cuando son raíces transgénicas, no se está activando la expresión de la construcción), seleccionándose únicamente aquellas raíces transgénicas que mostraron fluorescencia (verde para la construcción de sobreexpresión y roja para la de silenciamiento, Figuras 11 y 12).

### **7.7 Cuantificación de nódulos y medición de diámetros**

Con la finalidad de determinar el efecto del silenciamiento o la sobreexpresión de *PvFER1* en el proceso de nodulación, específicamente en el número de nódulos formados y su tamaño, se generaron plantas de frijol con raíces transgénicas portadoras de la construcción de silenciamiento *ptdT-FER1i5'* o la construcción para sobreexpresión *pH7-FER1*. Estas plantas seleccionadas se transplantaron a vermiculita y se inocularon con la clona de *R. tropici* CIAT 899 que expresa la enzima glucoronidasa (GUS) (Tabla S3, Lee and Schoffl, 1997): A los 7, 14 y 21 dpi se retiraron las plantas de la vermiculita, se limpiaron las raíces, y se realizó una segunda selección de raíces transgénicas fluorescentes. Las raíces seleccionadas se colocaron en cajas Petri, se realizaron dos lavados con las soluciones I ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 M,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  0.1 M,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  0.1 M) y II (solución I, EDTA 0.5 M, TRITON 10 %) respectivamente, y se dejaron incubando en la solución de tinción GUS (solución II, X-Gluc 50 mM) durante 16 horas (Lee and Schoffl, 1997). Se hicieron lavados con agua destilada estéril y se desgasificó la caja. Las raíces se aclararon con

cloro al 1% y finalmente se adquirieron imágenes de las mismas para su análisis mediante el software imageJ. Finalmente, las raíces fueron almacenadas en glicerol y DMSO (99:1).

### **7.8 Medición de la actividad de la nitrogenasa**

Con el objetivo de evaluar la actividad de la nitrogenasa, se realizó la medición indirecta a través de la evaluación de la reducción de acetileno descrita por Hardy K (1968). Primeramente, se generaron plantas de frijol con raíces transgénicas portadoras de la construcción de silenciamiento *ptdT-FER1i5'* o la construcción para sobreexpresión *pH7-FER1*. Estas plantas con raíces transgénicas seleccionadas se transplantaron en vermiculita y se inocularon con la clona de *R. tropici* CIAT 899 que expresa GUS. A los 21 y 30 dpi se retiraron las plantas de la vermiculita y se limpiaron las raíces, de las cuales se hizo una segunda selección de raíces fluorescentes, retirándose las que no presentaron fluorescencia. A continuación, se colocaron las raíces seleccionadas en frascos de vidrio sellados completamente, a cada frasco se les retiraron 2 mL de aire con una jeringa y se les adicionaron 2 mL de acetileno, se dejaron incubando a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, y finalmente se midió la cantidad de acetileno reducido a etileno mediante cromatografía de gases (Hardy *et al.*, 1968). Los valores obtenidos fueron procesados y ajustados en función al tiempo de incubación y al peso seco del total de nódulos de cada planta (Hardy *et al.*, 1968; Burris, 1972).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Análisis bioinformático

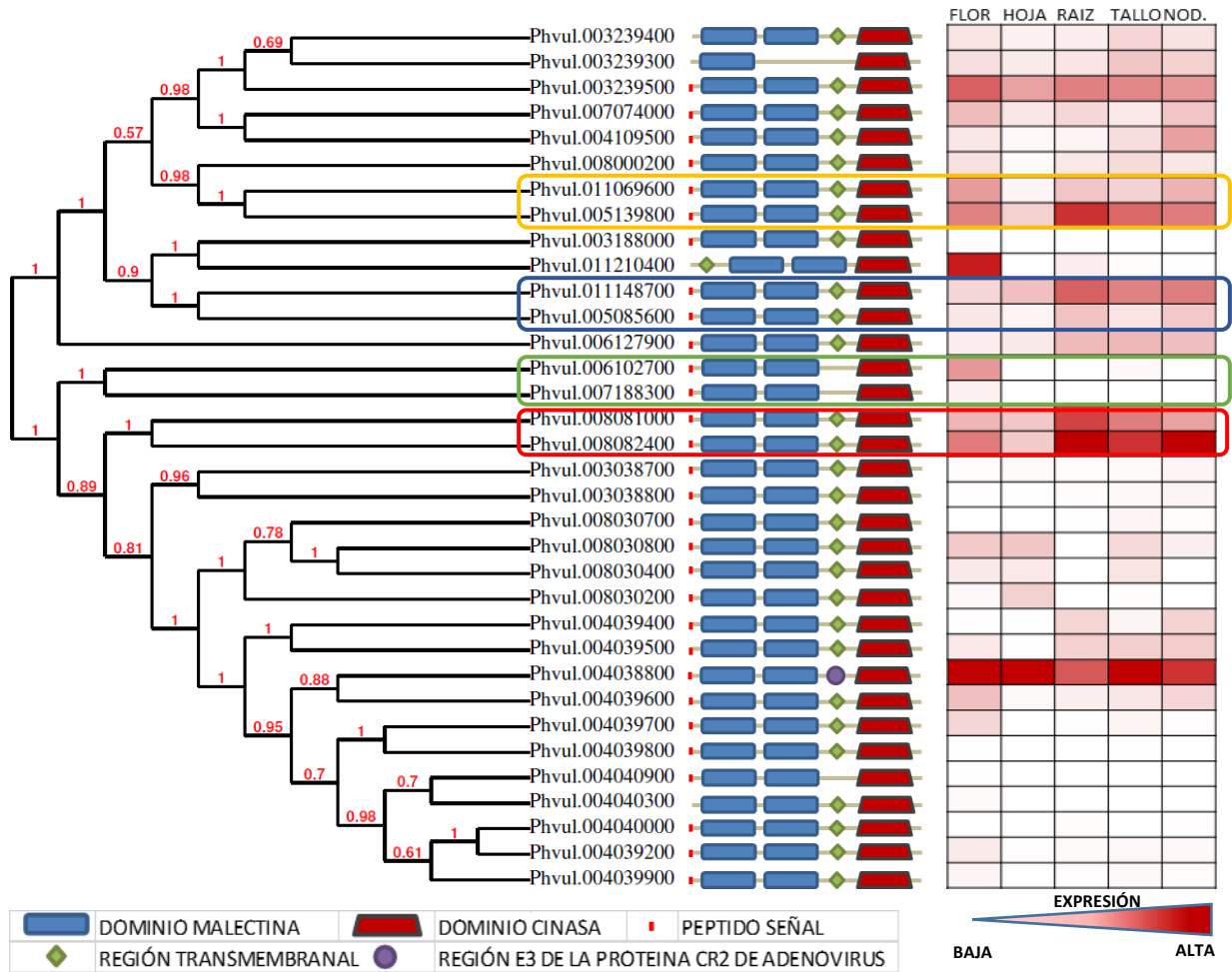
Con la finalidad de determinar el número de miembros de la subfamilia CrRLK1L en frijol, se realizó una búsqueda informática empleando la secuencia nucleotídica de FER (AT3G51550) como “query” y se discriminó entre aquellas secuencias que no presentaron dominios “Malectin-Like”. De este análisis se determinó en primer lugar que en frijol la familia de receptores de membrana CrRLK1L está compuesta por 34 miembros, los cuales presentan un tamaño promedio de 825 aminoácidos, y todos ellos presentan el dominio cinasa y al menos un dominio malectina de unión a carbohidratos (Tabla 2).

Tras un análisis más a fondo, se obtuvo la asignación de secuencias correspondientes a varios integrantes de la subfamilia que han sido descritos con base en su alta identidad con estas proteínas. Se puede observar en los recuadros rojos las dos secuencias proteicas que presentaron mayor identidad con FERONIA (Figura S1), en verde aquellas que presentan una mayor identidad con ANXUR 1 y 2 (ANX 1/2); en los recuadros azules las dos proteínas que tienen identidad más alta con THESEUS (THE); en amarillo dos secuencias con mayor identidad con HERKULES (HERK) (Tabla 2).

En el mapa de calor (Tabla 2) se puede apreciar que los genes que presentan los niveles más altos de expresión en raíces, de acuerdo a los datos de PHYTOZOME (Goodstein *et al.*, 2012), son los correspondientes a los genes Phvul.008G081000 y Phvul.008G082400, los cuales poseían la identidad más alta con FERONIA (las primeras dos) y el gen Phvul.005G139800 con HERKULES. En el caso de los nódulos, nuevamente el gen Phvul.008G082400 es el que presenta la expresión más alta en este tejido, seguido por Phvul.004G038800, el cual tiene la particularidad de codificar una región aminoacídica con homología a la región E3 de la proteína CR2 de adenovirus.

Mediante el análisis filogenético en el cual se incluyeron las secuencias de los 34 miembros de la subfamilia CrRLK1L de frijol, los 17 de la familia de *Arabidopsis*, 36 de *Medicago truncatula* y 46 de *Glicine max* (Figura 6), se determinó que dos miembros de esta familia en frijol compartían clado con FERONIA, así como dos proteínas de *M. truncatula* y dos de *G. max* (recuadro rojo) (Figura 6).

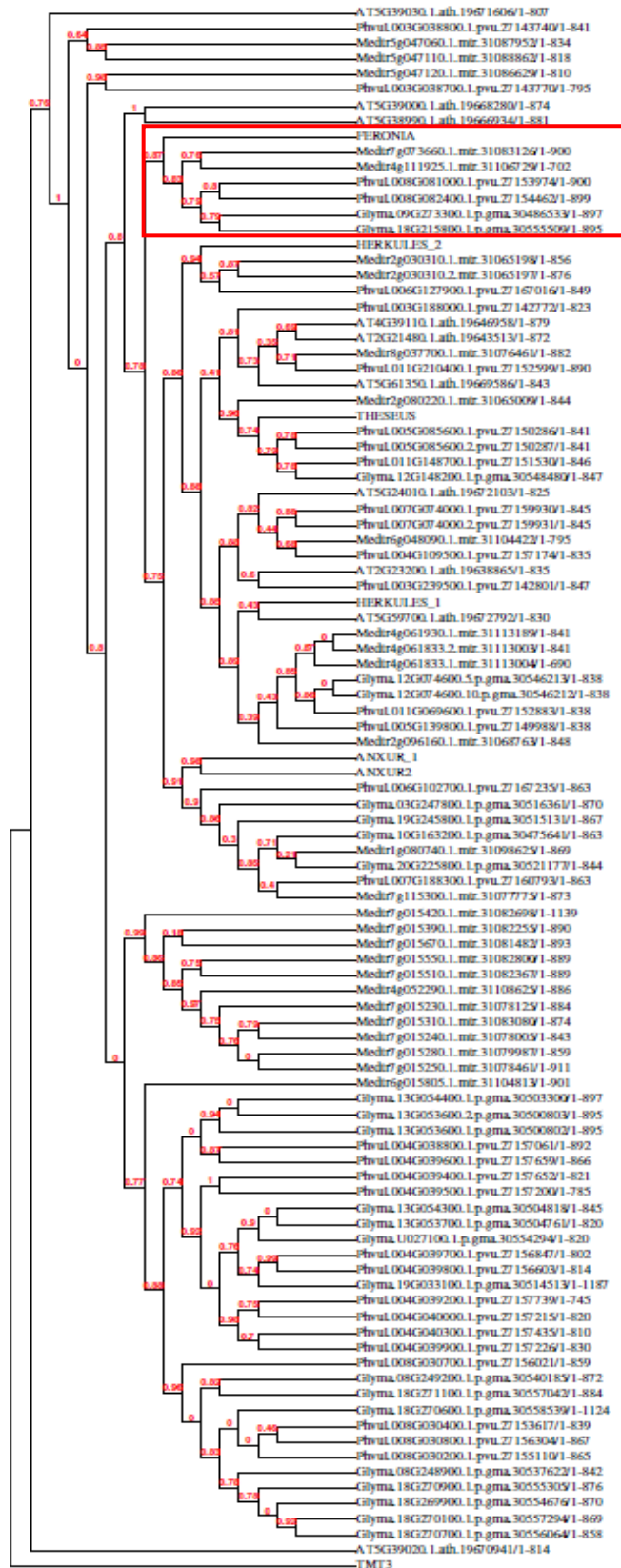
**Tabla 2. Familia de receptores tipo cinasa CrRLK1L en frijol.** En la tabla se muestran los 34 miembros de la familia CrRLK1L en frijol. En el recuadro rojo se muestran las dos secuencias con mayor identidad a FERONIA; en verde las secuencias con mayor identidad con ANXUR1/2, en azul las dos secuencias con mayor identidad con THESEUS, y en amarillo las dos secuencias con mayor identidad con HERKULES. Todos los miembros conservan los dominios característicos cinasa y al menos un dominio de unión a carbohidratos de acuerdo al recurso bioinformático de SMART. A la derecha se observan un mapa de calor construido a partir de datos de expresión de PHYTOZOME. En este se representan los niveles de expresión de los diferentes miembros en cinco diferentes tejidos (flor, hoja, raíz, tallo y nódulo), los colores más oscuros representan los niveles más altos de expresión de cada tejido (Goodstein *et al.*, 2012).

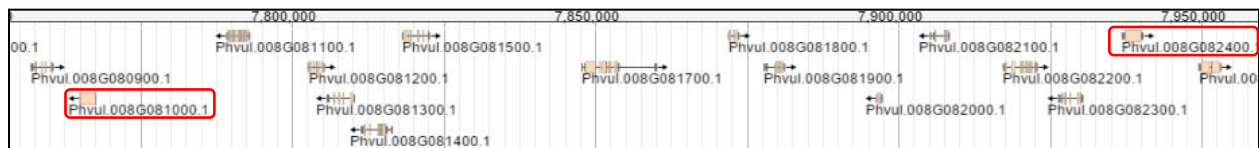


Al observar con mayor detalle el árbol, se confirmó que las secuencias con mayor identidad con las otras proteínas ya descritas de la familia de CrRLK1L, también compartían clados (Figura 6).

En base a estos resultados, se decidió trabajar con las dos secuencias proteicas que fueron ubicadas en el mismo clado del árbol que FER y que muestran mayor identidad de acuerdo al análisis bioinformático. Estas dos secuencias poseen un alto porcentaje de identidad entre sus secuencias tanto proteicas (I=94.9 %), como nucleotídicas (I=97 %). De acuerdo con el mapa genético de frijol en PHYTOZOME (Goodstein *et al.*, 2012), ambas se encuentran ubicadas dentro del cromosoma 8 en frijol, separados únicamente por 12 genes, una distancia aproximada de 200 Kb, y orientados uno en la cadena sentido y otro en la cadena antisentido, que podría ser un ejemplo de genes separados por un evento de duplicación (Figura 7).

**Figura 6. Árbol filogenético de la familia de receptores tipo cinasa CrRLK1L.** En este esquema se muestra un árbol filogenético de la familia de receptores CrRLK1L para *A. thaliana* y 3 Fabáceas (*P. vulgaris*, *M. truncatula*, *G. max*) realizado en "Phylogeny.fr" (Dereeper *et al.*, 2010). En el recuadro rojo se puede observar el clado en el cual se ubican AtFER, las dos proteínas de frijol seleccionadas como posibles candidatos y un par de secuencias proteicas de *M. truncatula* y un par de *G. max*. () En el árbol la distancia de las ramas no representa la máxima probabilidad. La proteína TMT3 (Tonoplast Monosaccharide Transporter 3) fue usada para la raíz del árbol.





**Figura 7. Ubicación y alineamiento de los genes Phvul.008G081000.1 (*PvFER1*) y Phvul.008G082400.1 (*PvFER2*).** Los genes seleccionados como candidatos que codifican PvFER se encuentran localizados en el cromosoma 8 de frijol, separados aproximadamente 200 kb (PHYTOZOME, Goodstein et al., 2012).

Finalmente, se comparó la acumulación de los transcritos de los genes de los distintos miembros de CrRLK1L en el atlas de expresión génica de frijol común (A common gene expression atlas, O'Rourke, *et al.*, 2014), en el que se pueden analizar los patrones de expresión de diferentes genes en diferentes tejidos, bajo diferentes tratamientos, medido en RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped reads).

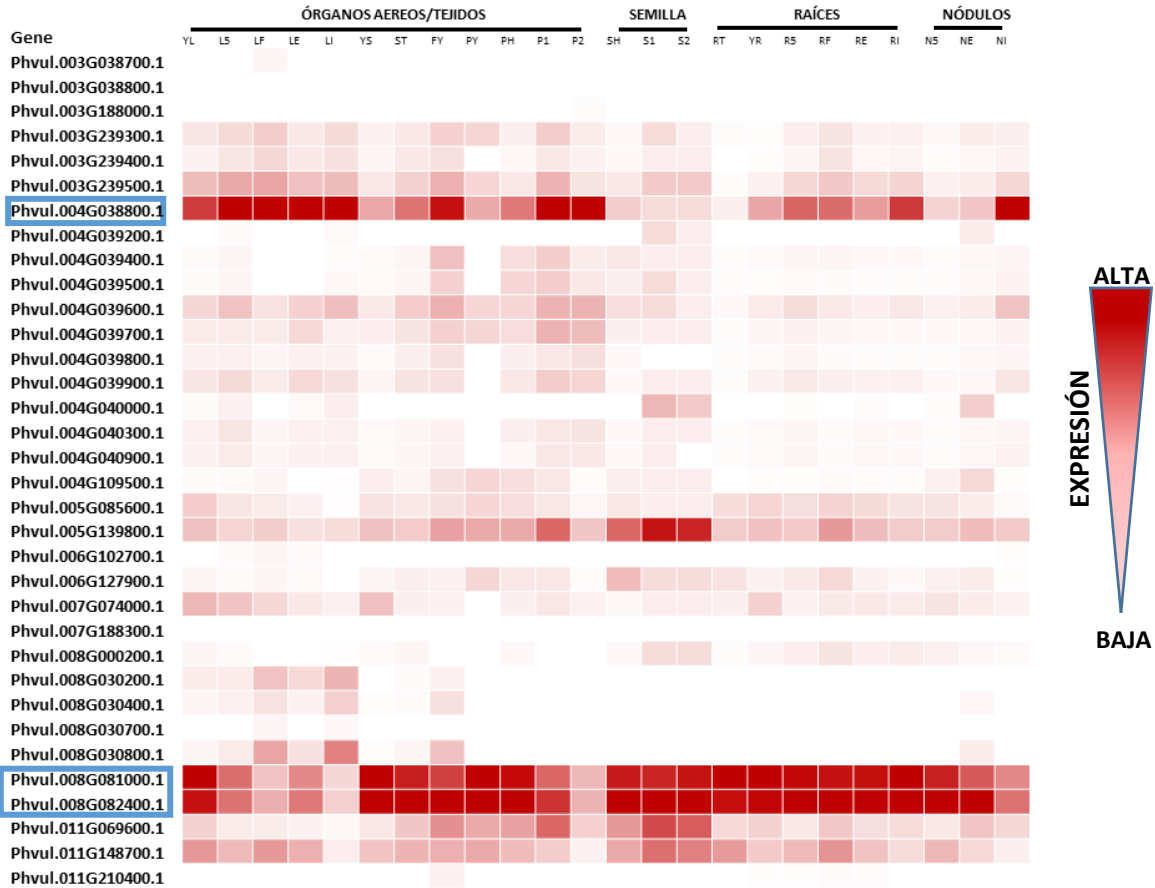
En la Figura 8 se observa un mapa de calor en el cual están representados los niveles de expresión de los miembros de la familia CrRLK1L de frijol reportados en el análisis de RNAseq de O'Rourke *et al.*, (2014). Se puede apreciar que los genes con mayor acumulación de transcrito en los diferentes tejidos analizados son Phvul.008G081000.1, Phvul.008G082400.1 y Phvul.004G038800.1. Los primeros dos corresponden a las secuencias que en el análisis filogenético comparten el mismo clado que FER de *Arabidopsis* (recuadro azul). Los niveles más altos de acumulación de los transcritos de dichos genes ocurren en raíces y nódulos bajo diferentes tratamientos. Se aprecia que los genes Phvul.008G081000.1 y Phvul.008G082400.1 presentan una mayor acumulación de transcrito en raíces completas colectadas durante el estado de desarrollo de generación del segundo trifolio (YR). Esa acumulación disminuye en raíces inoculadas 5 días posteriores a la inoculación (R5), y es aún menor en raíces desnoduladas que desarrollaron nódulos fijadores de nitrógeno de 21 días (RE). Al analizar la expresión de ambos transcritos en los nódulos fijadores de nitrógeno de 21 días (NE), se observó una menor acumulación de dicho transcrito, incluso más baja que en nódulos no fijadores de nitrógeno de 21 días (NI).

## 8.2 Análisis de la acumulación de los transcritos *PvFER1* y *PvFER2*

Con la finalidad de analizar la función de los dos genes encontrados en la búsqueda bioinformática ya descrita, primero se analizó la acumulación del transcrito de cada uno de ellos en raíces de frijol mediante RT-qPCR. Para esto se utilizaron plantas de frijol de 2 dpv debido a que a esta edad las raíces de las plantas de frijol presentan una gran cantidad de pelos radicales en crecimiento (de los



cuales algunos ya completaron su crecimiento, otros están en crecimiento y algunos más comienzan a emerger), y aun no hay presencia de raíces laterales. El análisis de la acumulación de los transcritos se llevó a cabo en el ápice de la raíz (0.5 a 1 mm de la punta de la raíz), en los pelos radicales, y en la raíz rasurada (correspondiente a la raíz sin los pelos radicales y sin el ápice).



**Figura 8. Mapa de calor que representa la expresión de los genes de frijol común pertenecientes a la familia CrRLK1L en diferentes condiciones.** Se puede observar que los genes que presentan la mayor acumulación de transcrito en los diferentes tratamientos son los genes Phvul.008G081000.1, Phvul.008G082400.1 y Phvul.004G038800.1 (recuadro azul). Se puede ver que los mayores niveles de acumulación de transcrito para dos de esos tres genes se dan en raíces y en nódulos bajo diferentes tratamientos, comparado con tejidos aéreos. YL- hojas de plantas en estado de segundo trifolios fertilizadas, L5- hojas de plantas a los 5 días post inoculación (dpi) con Rhizobium, LF- hojas de plantas fertilizadas 21 dpi, LE- hojas de plantas 21 dpi con Rhizobium WT, LI- hojas de plantas 21 dpi con Rhizobium inefectivo, YS- tallos de plantas en estado de segundo trifolios, ST- ápice de brotes de plantas en estado de segundo trifolios, FY- flores jóvenes, PY- vainas jóvenes, PH- vainas asociadas a semillas en estado corazón, P1- vainas asociadas a semillas en estado 1, P2- vainas asociadas a semillas en estado 2, SH- semillas en estado de corazón S1- semillas en estado 1, S2- semillas en estado 2, RT- ápices de raíz colectada de plantas fertilizadas en el estado de desarrollo de aparición del segundo trifolios; YR- raíces completas colectadas de plantas en el estado de desarrollo de aparición del segundo trifolios; R5-raíces completas separadas de nódulos de 5 dpi; RF-raíces completas de plantas fertilizadas colectadas al mismo tiempo que RE y RI; RE-raíces completas separadas de nódulos fijadores de 21 dpi; RI- raíces completas separadas de nódulos no fijadores de 21 dpi; N5-nódulos de 5 dpi; NE-nódulos fijadores de 21 dpi; NI-nódulos no fijadores de 21 dpi (Datos tomados de O'Rourke *et al.*, 2014).. Colores rojo oscuros representan expresión alta mientras que colores claros representan expresión baja.

Los resultados presentados en la Figura 9 muestran que la expresión relativa del gen al que llamamos *PvFER1* es mayor en pelos radicales que en el ápice de la raíz y que en la raíz rasurada (Figura 9A). El gen *PvFER2* muestra también una acumulación relativa mayor en los pelos radicales comparado con la raíz rasurada o el ápice de la raíz (Figura 9B). Sin embargo, al comparar el nivel de acumulación relativa de cada gen se observa una acumulación diez veces mayor del transcrito *PvFER1* respecto al *PvFER2* (Figura 9C).

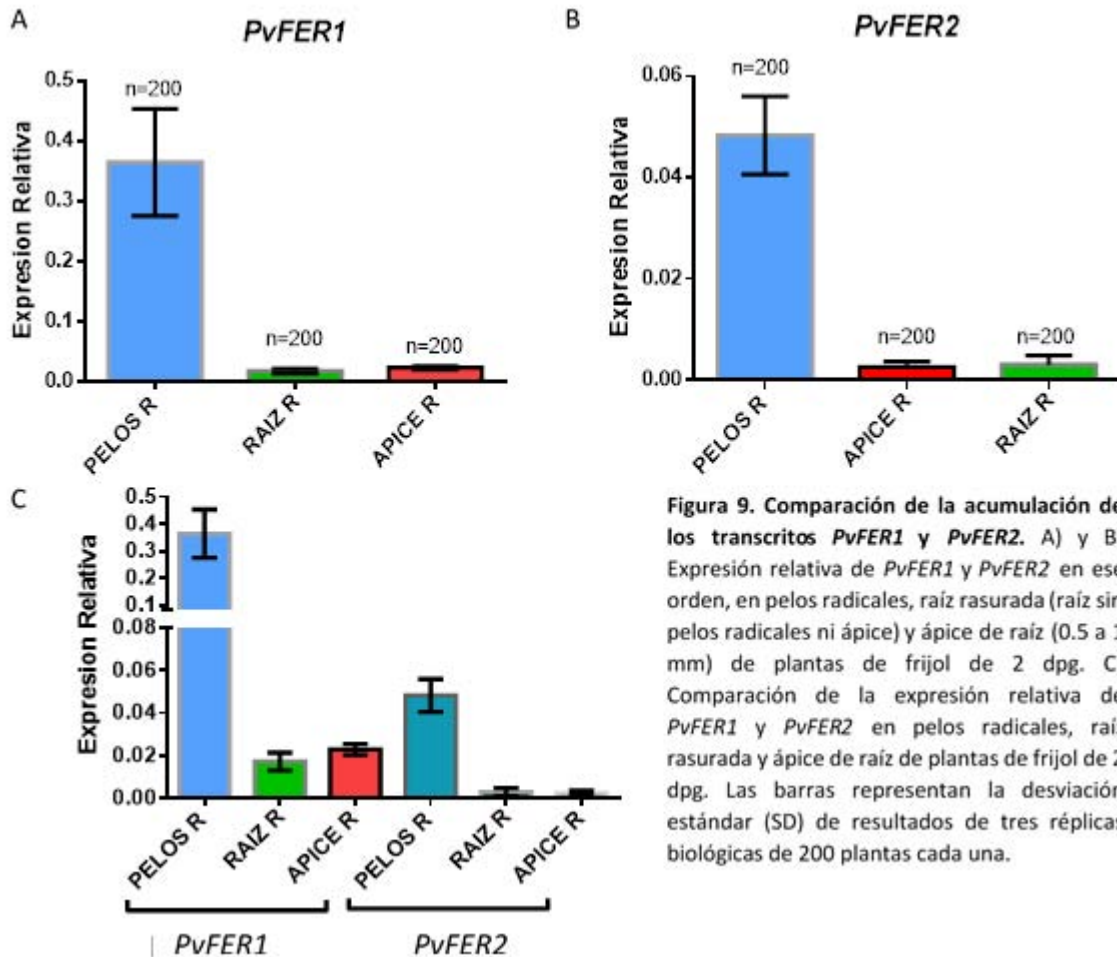
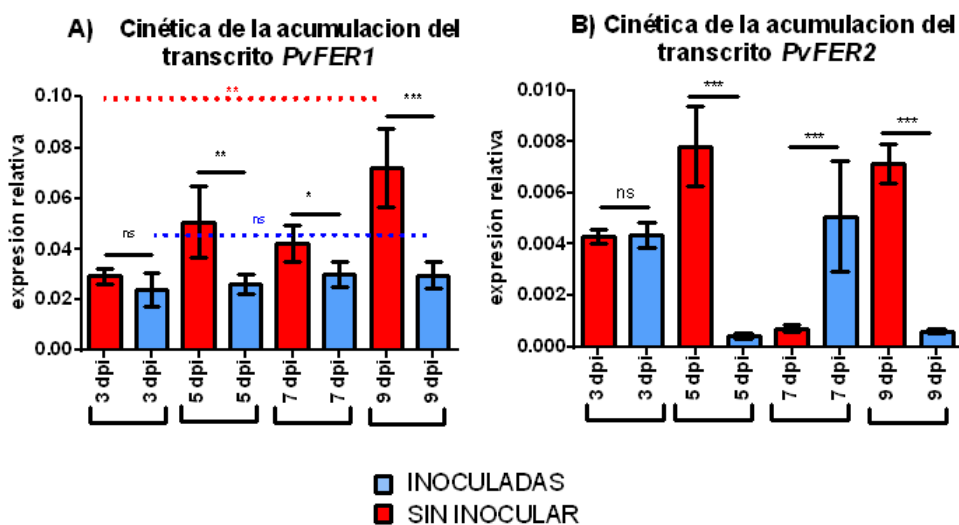


Figura 9. Comparación de la acumulación de los transcritos *PvFER1* y *PvFER2*. A) y B) Expresión relativa de *PvFER1* y *PvFER2* en ese orden, en pelos radicales, raíz rasurada (raíz sin pelos radicales ni ápice) y ápice de raíz (0.5 a 1 mm) de plantas de frijol de 2 dpj. C) Comparación de la expresión relativa de *PvFER1* y *PvFER2* en pelos radicales, raíz rasurada y ápice de raíz de plantas de frijol de 2 dpj. Las barras representan la desviación estándar (SD) de resultados de tres réplicas biológicas de 200 plantas cada una.

Con la finalidad de analizar el perfil de acumulación del transcrito *PvFER1* en las raíces de frijol en función del tiempo, tanto en condiciones de inoculación como sin inocular, se realizaron ensayos de RT-qPCR en raíces de frijol durante el desarrollo de nódulos y en las raíces no inoculadas. Cuando se analizó la expresión relativa del gen en raíces sin inocular se observó un aumento en la acumulación de transcrito en los primeros 7 dpj ( $P < 0.05$ ), que se mantiene a los 9

dpg ( $P > 0.05$ ) y que incrementa a los 11 dpg ( $P < 0.05$ ). En el caso de raíces inoculadas, los niveles de acumulación de transcrito son similares a los 3, 5, 7 y 9 dpi ( $P > 0.05$ , Figura 10A). En el caso de la acumulación de transcrito del gen *PvFER2* (Figura 10B) en raíces de frijol bajo las mismas condiciones que *PvFER1*, se observó que el comportamiento es más variable: a los 3 dpi las raíces control tuvieron un aumento en la acumulación de casi el 100% con respecto a los 3 dpi ( $P < 0.05$ ), mientras que las raíces inoculadas presentaron una acumulación 10 veces menor que a los 3 dpi ( $P < 0.05$ ). Para los 7 dpi se observó un comportamiento opuesto, viéndose una disminución de la acumulación de transcrito en las plantas control ( $P < 0.05$ ), mientras que en plantas inoculadas se observó un nivel similar al de los 3 dpi en plantas inoculadas. Finalmente, a los 9 dpi las plantas control mostraron una acumulación comparable a la de plantas control de 5 dpi, mientras que en plantas inoculadas la acumulación disminuyó a niveles similares a los 5 dpi. En base a todos estos resultados se decidió trabajar con la caracterización funcional del gen *PvFER1*.



**Figura 10. Cinética de acumulación de los transcritos de los genes *PvFER1* y *PvFER2*.** Representación gráfica de la acumulación del transcrito del gen *PvFER1* (A) y el del gen *PvFER2* (B) en raíces de frijol inoculadas 3, 5, 7 y 9 dpi y sin inocular con los mismos días post germinación (3 dpi = 5 dpg, 5 dpi = 7dpg, 7 dpi = 9 dpg, 9 dpi = 11 dpg). Se puede observar que en raíces inoculadas los niveles de acumulación de *PvFER1* se mantienen constantes durante el tiempo analizado, mientras que en plantas sin inocular se observan variaciones en la acumulación del transcrito a lo largo del tiempo. En el caso de *PvFER2* los niveles de acumulación del transcrito se observan erráticos. Las líneas representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas de tres réplicas biológicas cada una ( $n=9$ ). Las líneas punteadas rojas representan el resultado del análisis estadístico ANOVA de las muestras sin inocular, las líneas punteadas azules representan el resultado del análisis estadístico ANOVA de las muestras inoculadas, las líneas negras representan el resultado del análisis estadístico al comparar las muestras inoculadas y sin inocular a tiempo iguales (*t student*), los asteriscos representan el valor de significancia ( $P < 0.05$ ); ns, no significativo.

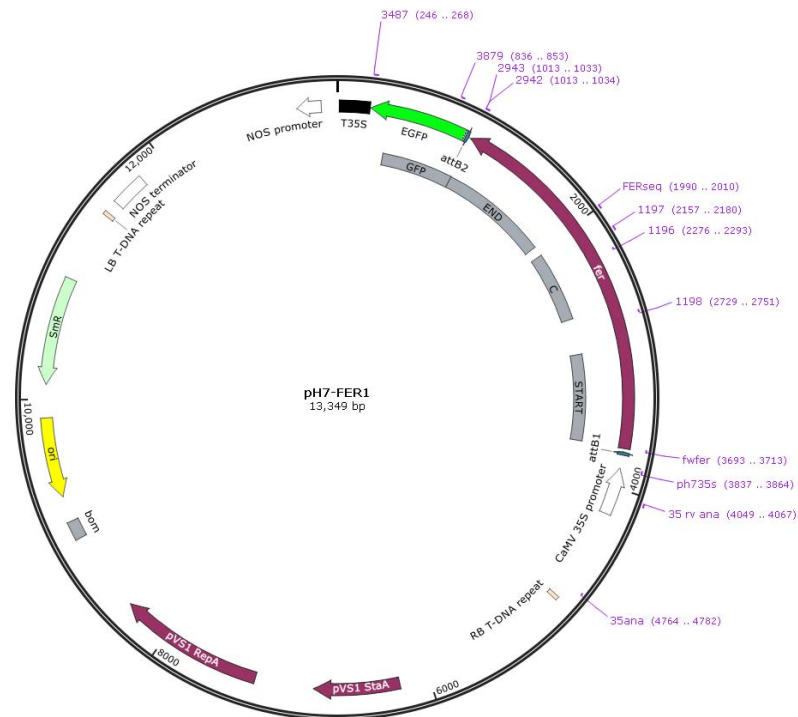
### 8.3 Construcciones para la sobreexpresión o el silenciamiento del gen *PvFER1*

Para evaluar la función del gen *PvFER1* en raíces de frijol por genética reversa, se realizó la construcción de los vectores para el silenciamiento mediante RNAi o la sobreexpresión de dicho gen.

Se sintetizaron un par de oligonucleótidos para generar una construcción para sobreexpresión (*PvFER1oex*, Tabla 1). Empleando los oligonucleótidos generados (*PvFER1oex*) se procedió a la generación de las construcciones. Para ello se realizó una amplificación por PCR con el par de primers empleando la enzima de alta fidelidad “Taq Phusion Polymerase” de Thermo Scientific, y los fragmentos obtenidos se purificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa. Dichos fragmentos se clonaron en el vector de entrada “pENTR directional TOPO” de “Invitrogen”; mediante secuenciación se confirmó que las construcciones eran correctas. A partir de éstas, se realizó la recombinación de los fragmentos en el vector destino pH7FWG2D, usando la enzima LR clonasa, aprovechando el sistema Gateway. El resultado fue el vector para sobreexpresar el gen *PvFER1* (pH7-FER1): posee la secuencia codificante de *PvFER1* en fusión con la proteína verde fluorescente (EGFP) -que puede ser empleada para la selección de raíces transgénicas en base a la fluorescencia- bajo la expresión del promotor 35s, una secuencia codificante de una proteína de resistencia a espectinomicina, y los elementos necesarios para la recombinación en planta (Figura 11). Como control negativo se utilizó el vector pH7-GUS-GFP.

Para la construcción para el silenciamiento de *PvFER1*, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, uno en la región no codificante 5' (*PvFER1i5'*) y otra en la región no codificante 3' (*PvFER1i3'*) del mensajero (Tabla 2). Para generar tales las construcciones se realizaron amplificaciones por PCR con cada par de primers con la enzima de alta fidelidad “Taq Phusion Polymerase” de Thermo Scientific, y los fragmentos obtenidos se purificaron a partir de un gel de agarosa. Dichos fragmentos se clonaron en el vector de entrada “pENTR directional TOPO” de “Invitrogen”, y mediante secuenciación se confirmó que las construcciones fueran correctas. A partir de éstas se realizó la recombinación de los fragmentos en el vector destino ptdT, usando la enzima LR clonasa, aprovechando el sistema Gateway.

El resultado son dos vectores para silenciar *PvFER1* (*ptdT-FER1i5'* y *ptdT-FER1i3'*), del cual se seleccionó *ptdT-FER1i5'* para la generación de raíces transgénicas (Figura 12). El vector posee la secuencia codificante de una proteína roja fluorescente (tdTomato) para la selección de raíces transgénicas en base a la fluorescencia, bajo la expresión del promotor NOS, una secuencia codificante de una proteína de resistencia a espectinomicina, los elementos necesarios para la recombinación en planta, y bajo expresión del promotor 35s, un duplicado del inserto separado por una secuencia que permite formar la estructura tipo haza necesaria para emplearse como RNA de interferencia (Figura 12). Como control negativo se utilizó el vector ptdT-SAC, el cual porta un inserto de secuencia aleatoria.

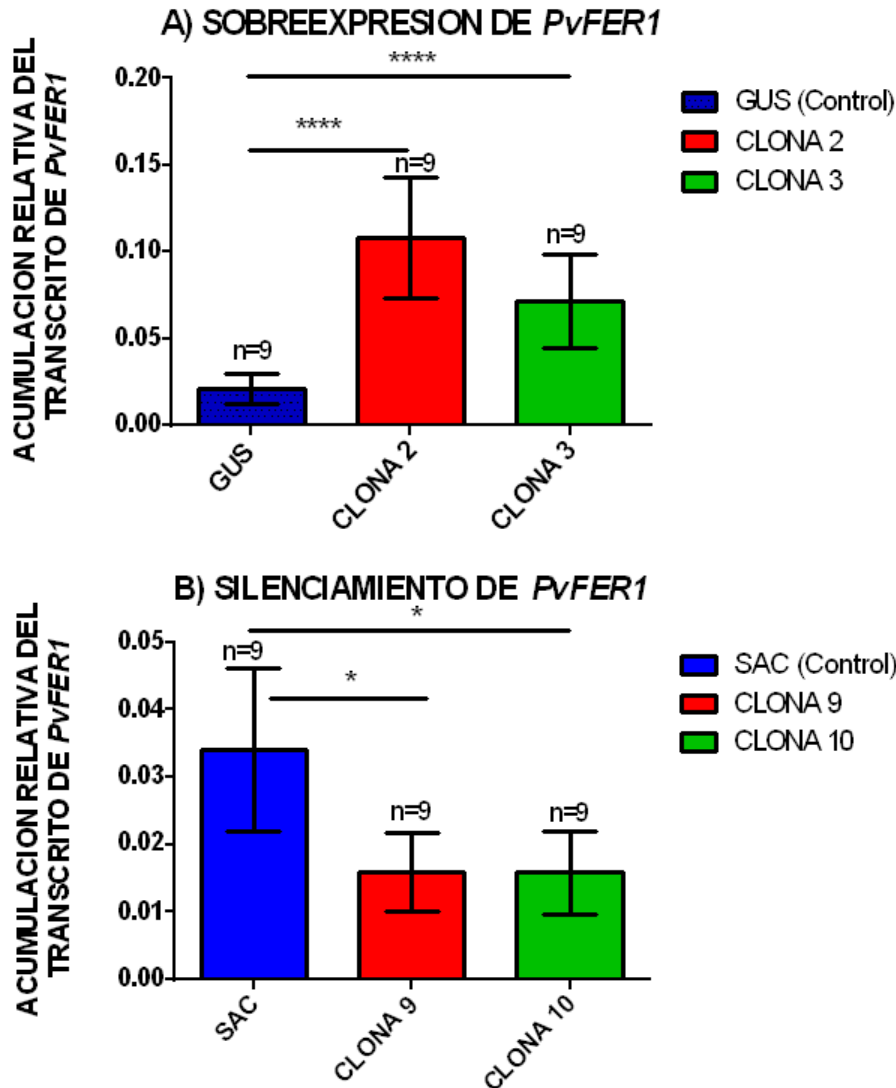


**Figura 11. Vector para la sobreexpresión del gen *PvFER1* en raíces de frijol.** Se ilustra la construcción generada para la sobreexpresión de *PvFER1* en raíces peludas de frijol. En morado se aprecian marcados los sitios de los diferentes oligonucleótidos empleados para confirmar la presencia del inserto y la orientación adecuada del mismo. La expresión del *PvFER1* está regulado bajo el promotor 35s, y para seleccionar bacterias que captaron el vector, este codifica una proteína que otorga resistencia a espectinomicina.

#### 8.4 Análisis de las raíces transgénicas sobreexpresantes o silenciadas en *PvFER1*

Con la finalidad de analizar la acumulación de transcrito en raíces transgénicas sobreexpresantes o silenciadas en *PvFER1* en frijol, se generaron raíces transgénicas de frijol silenciadas y sobreexpresantes, y se seleccionaron aquellas raíces transgénicas que presentaron fluorescencia.





**Figura 13. Acumulación de transcrito *PvFER1* en raíces transgénicas de frijol.** En A, se observa el nivel de acumulación del transcrito de las raíces generadas con la construcción para sobreexpresión del gen *PvFER1* (pH7-FER1), las raíces de plantas transformadas con la clona 2 portadora de dicha construcción muestra un aumento de aproximadamente 5 veces la acumulación de transcrito con respecto a las raíces control (transformadas con el vector control pH7-GUS) mientras que la clona 3 muestra un aumento de acumulación de 3 veces. B, acumulación de transcrito en raíces de plantas de frijol transformadas con la construcción para silenciamiento (ptdT-FER1i5'); las raíces transformadas con la clona 9 y 10 muestran una disminución del 50 % respecto a raíces transformadas con el vector control ptdT-SAC. Las barras representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas (n=9), las cuales en cada una se analizaron las raíces transgénicas de tres plantas independientes, normalizadas con respecto al factor de elongación 1 $\alpha$  (ef1 $\alpha$ ). Los asteriscos representan el valor de

En el caso de las raíces silenciadas en *PvFER1*, nuevamente se evaluaron 10 clonas diferentes para la selección de raíces transgénicas y su posterior inoculación. Se puede apreciar que con las clonas 9 y 10 se obtuvo una disminución en la acumulación de transcrito, correspondiendo a

aproximadamente el 50% de las raíces control (Figura 13), mostrando desviaciones estándar similares entre ellas. De estas clonas se decidió trabajar con la clona 10.

### **8.5 Análisis del fenotipo de las raíces transgénicas de frijol**

Con el objetivo de evaluar los efectos del cambio en la acumulación del transcrito *PvFER1* en frijol, y de acuerdo a los objetivos planteados para el proyecto, se analizó el fenotipo de las raíces transgénicas sobreexpresantes del gen *PvFER1* generadas con la clona 2, así como de las raíces silenciadas en *PvFER1* generadas con la clona 10. Los fenotipos analizados fueron: el número de nódulos formados, los diámetros de los mismos y la actividad de la nitrogenasa.

#### **8.5.1 Número de nódulos y diámetro**

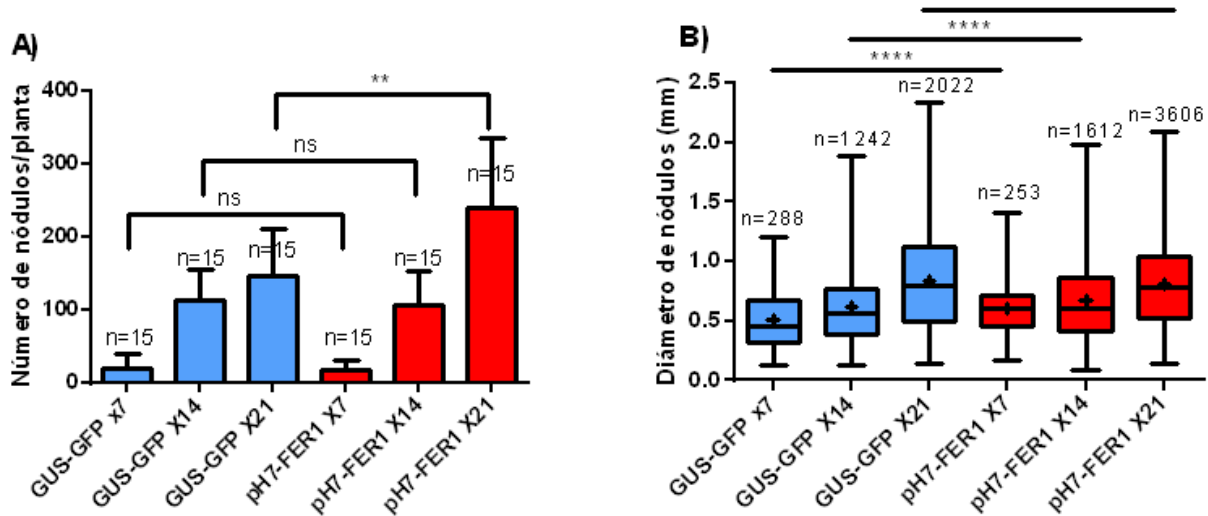
Para determinar el efecto del incremento y la disminución en la acumulación de transcrito *PvFER1* en raíces transgénicas de frijol inoculadas con rhizobia, las raíces sobreexpresantes y silenciadas de frijol se inocularon con *R. tropici*-GUS, la cual porta una construcción que codifica para la proteína glucoronidasa (GUS) como marcador visual. El número total de nódulos generados por planta en cada tratamiento a los 7, 14 y 21 dpi, así como el diámetro de cada uno de ellos se comparan con los resultados obtenidos en las plantas control.

La Figura 14 muestra los resultados observados en plantas con raíces transgénicas sobreexpresantes de *PvFER1*. A los 7 y 14 dpi se obtuvieron cantidades similares de nódulos por planta (18 nódulos por planta en raíces sobreexpresantes y 20 nódulos en las plantas control a los 7dpi respecto a la planta control, 106 nódulos en las sobreexpresantes y 114 en raíces control a los 14dpi;  $P > 0.05$ ). A los 21 dpi se pudo observar un mayor número de nódulos en las raíces sobreexpresantes de *PvFER1*, que llegan a generar 240 nódulos por planta, mientras que en las raíces control de 21 dpi hay 147 nódulos en promedio por planta, es decir un incremento de 30% respecto a los 7 dpi ( $P < 0.05$ ).

El diámetro que alcanzan los nódulos se analizó en cada tiempo y condición. A simple vista se pudo notar que existía diferencia en el diámetro de los nódulos de las raíces sobreexpresantes de *PvFER1* respecto al control a los 7 y 14 dpi. Para apreciar de forma clara, si en realidad existía una diferencia en el diámetro de los nódulos, se decidió analizar la distribución de los diámetros de todos los nódulos mediante una gráfica de cajas y bigotes (Figura 14B). En esta gráfica se representa la distribución de los diámetros de toda la población analizada dividida en 4 cuadriles,



el primer cuadril, correspondiente al bigote inferior, corresponde a la distribución de los diámetros que posee el 25 % de la población con los diámetros menores incluido el inferior, mientras que el bigote superior representa la distribución del 25 % de la población con los diámetros mayores más el superior. Las cajas representan el 50 % de la población restante, con los diámetros más cercanos a la mediana poblacional, la cual es representada por la línea de en medio. La cruz dentro de las cajas representa la media.



**Figura 14. Número de nódulos por planta y diámetro de nódulos en raíces sobreexpresantes de *PvFER1*.** En A, puede observarse la variación en el número de nódulos presentes por planta en raíces sobreexpresantes de *PvFER1* (barras rojas) a los 7, 14 y 21 dpi con respecto al control (barras azules); no se observa diferencia en el número de nódulos a los 7 o 14 dpi respecto al control, pero el comportamiento cambia a los 21 dpi, donde existe un aumento en el número de nódulos en las raíces sobreexpresantes respecto al control. Las barras representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas con cinco raíces cada una. Los asteriscos representan el valor de significancia (t student,  $P < 0.05$ ); ns, no significativo. En B, se analiza el diámetro de todos los nódulos generados en los distintos tiempos; se observa que la mayoría de nódulos de las raíces sobreexpresantes son más pequeños que los nódulos de plantas control, y el tamaño máximo que alcanzan los mismos suele ser inferior en las sobreexpresantes. Los asteriscos representan el valor de significancia (Mann-Whitney test,  $P < 0.05$ ); ns, no significativo; s, representan el valor de significancia (t student,  $P < 0.05$ ).

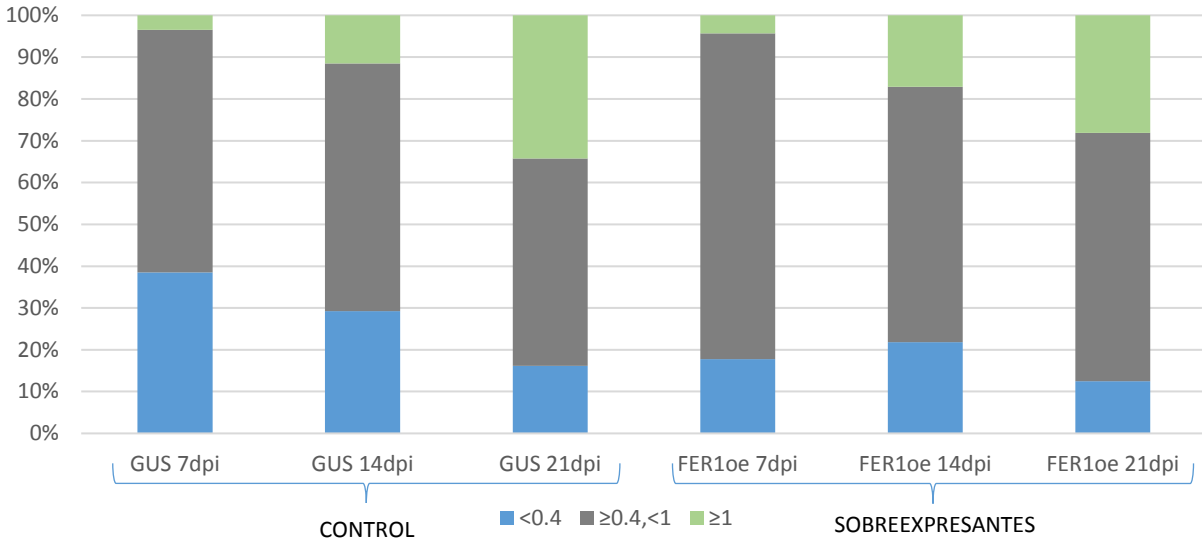
Cuando se analizó la gráfica de cajas y bigotes (Figura 14B), se observó que a los 7dpi los nódulos de raíces sobreexpresantes alcanzaron diámetros mayores ( $P < 0.05$ ): el 50% de los nódulos de las raíces sobreexpresantes tuvieron un diámetro comprendido entre 0.4 y 0.7 milímetros (mm) con un máximo de 1.4 mm, mientras que el 50% de los nódulos en las raíces control alcanzaron diámetros entre 0.4 y 0.6 mm con un máximo de 1.2 mm a los 7dpi. A los 14 dpi esa diferencia disminuye, observándose distribuciones en el diámetro de los nódulos similares entre las raíces sobreexpresantes de *PvFER1* y las plantas control (el 50% de los nódulos en ambos casos poseen

diámetros entre 0.4 y 0.7 mm con una mediana de 0.55 mm,  $P < 0.05$ ). A los 21 dpi, se logró ver una ligera disminución en los diámetros de los nódulos de las raíces sobreexpresantes respecto a los de las plantas control, ya que el 50% de éstos poseyeron diámetros desde los 0.4 mm hasta 1 mm, comparado con los nódulos de las raíces control que mostraron diámetros de entre 0.4 mm y 1.2 mm (Figura 14B): al comparar a 21 días mediante pruebas no paramétricas no se observa diferencia significativa ( $P > 0.05$ ), mientras que al comparar mediante pruebas paramétricas (t-student) si resulta existir una diferencia significativa. Al analizar el diámetro máximo que alcanzaron los nódulos de las raíces sobreexpresantes a los 21 días, se observa que también este es menor respecto a las raíces control, éste fue de 2.1 mm y 2.4 mm respectivamente.

Al analizar las distribuciones porcentuales de los diámetros de los nódulos de raíces sobreexpresantes de *PvFER1* respecto a las raíces control (Figura 15), se observó que la proporción de nódulos a los 7 y 14 dpi con nódulos iguales o mayores a 1 mm (gris) no varió significativamente entre aquellos de raíces sobreexpresantes respecto a los del control, sin embargo a los 21 dpi la proporción de nódulos con diámetros por encima de 1 mm (gris) es menor en raíces sobreexpresantes, siendo del 28 %, mientras que en las raíces control éstos fueron el 35 % de los nódulos totales.

Los resultados descritos sugieren que el aumento en la acumulación de transcrito del gen *PvFER1*, provoca un aumento en el número de nódulos a los 21 dpi, siendo estos nódulos ligeramente más pequeños que en el control.

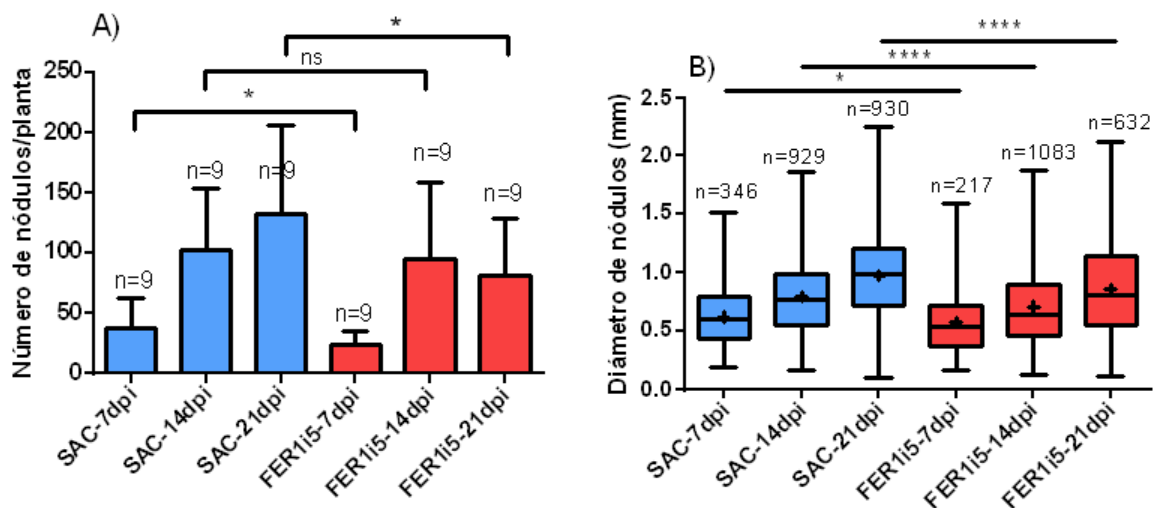
Basados en la misma estrategia experimental que en las raíces sobreexpresantes, se realizó el análisis del número y del diámetro de nódulos generados en raíces silenciadas en el gen *PvFER1*. En la Figura 16A se muestra la gráfica obtenida del análisis del número de nódulos por planta generados en las raíces silenciadas y de su respectivo control. Se observó que a los 7 dpi hubo una ligera disminución en el número de nódulos por planta en las raíces silenciadas respecto al control ( $P < 0.05$ ), a los 14 dpi no hay una diferencia significativa en el número de nódulos por planta generados en las raíces silenciadas en *PvFER1* respecto al control ( $P > 0.05$ ), sin embargo, a los 21 dpi se apreció nuevamente una disminución en el número de nódulos en las plantas silenciadas ( $P < 0.05$ ).



**Figura 15. Distribución porcentual en el diámetro de nódulos en raíces sobreexpresantes.** La gráfica representa la distribución de los diámetros de los nódulos contabilizados y medidos en raíces sobreexpresantes a los 7, 14 y 21 dpi, los cuales se separaron por diámetros en 3 grupos: el primero grupo comprende los nódulos con diámetros por debajo de 0.4 mm (azul), en el segundo son nódulos con diámetros entre 0.4 mm y por debajo de 1 mm (gris), el tercer grupo comprende los nódulos con diámetros mayores o iguales a 1 mm (verde). Los resultados mostrados corresponden a los nódulos generados en las raíces transgénicas de 15 plantas en total, correspondientes a tres réplicas biológicas.

Al analizar los diámetros de los nódulos de estas plantas se pudo observar que desde los 7 dpi hubo una disminución en el diámetro de los nódulos en plantas silenciadas en *PvFER1*, que puede apreciarse hasta los 21 dpi ( $P < 0.05$ ). A los 7dpi el 50% de los nódulos más cercanos a la mediana poblacional de las raíces silenciadas presentaron un diámetro menor que los nódulos de las raíces control ( $P < 0.05$ ); se observa (Figura 16B) que en los nódulos de raíces silenciadas, el 50 % de los nódulos más cercanos a la mediana 0.35 mm a 0.6 mm y una mediana de 0.5mm, mientras que los nódulos de raíces control más cercanos a la mediana poblacional mostraron diámetros de entre 0.4 a 0.7 mm con una mediana de 0.6 mm. A los 14 días, nuevamente las raíces silenciadas presentaron nódulos con diámetros ligeramente menores a los de raíces control ( $P < 0.05$ ), ya que el 50 % de los nódulos de raíces disminuidas en la acumulación de transcrito *PvFER1* poseyeron diámetros entre 0.45 a 0.9 mm y una mediana de 0.65 mm, mientras que en el control el 50% de los nódulos mostraron diámetros distribuidos entre 0.6 a 1.2 mm con una mediana de 1 mm. Finalmente, a los 21 dpi fue más evidente esta diferencia en los diámetros de los nódulos ( $P < 0.05$ ), ya que el 50 % de los nódulos de las raíces silenciadas alcanzaron diámetros comprendidos entre 0.55 mm a 1.1 mm, con una mediana de 0.8 mm, mientras que en las raíces control el 50% de los nódulos mostraron diámetros entre 0.7 mm y 1.2 mm con una mediana de 1 mm, nuevamente por encima

de los valores observados en las raíces silenciadas. A los 21 dpi se pudo apreciar que en las raíces silenciadas los nódulos más grandes alcanzaron un diámetro máximo de 2.1 mm, mientras que los de las raíces control alcanzaron diámetros mayores (2.25 mm).

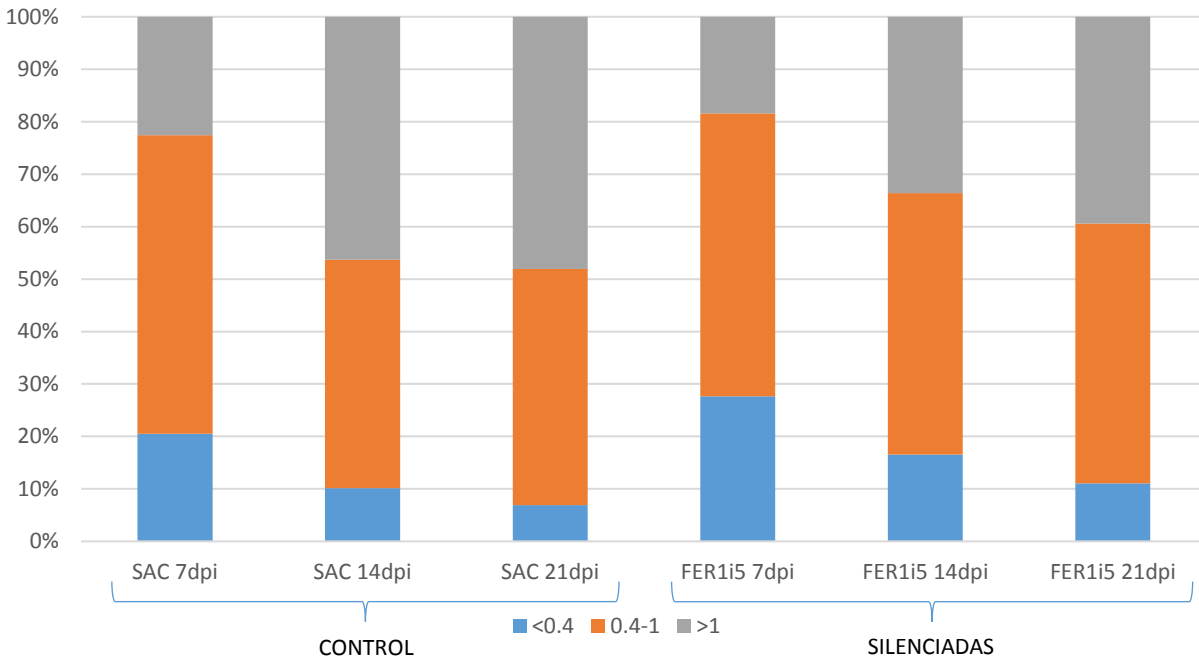


**Figura 16. Número de nódulos por planta y diámetro de nódulos en raíces silenciadas en *PvFER1*.** En A, puede observarse la variación en el número de nódulos presentes por planta en raíces silenciadas en *PvFER1* (barras rojas) a los 7, 14 y 21 dpi con respecto al control SAC (barras azules). Se observa a los 7 dpi una ligera disminución en el número de nódulos en raíces silenciadas respecto a las raíces control, a los 14 días post inoculación no hay diferencia significativa respecto al control, sin embargo, a los 21 dpi se observa una disminución en el número de nódulos, correspondiente al 40 % en el número de nódulos por planta en las raíces silenciadas respecto al control. Las barras representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas de tres réplicas biológicas cada una. Los asteriscos representan el valor de significancia (t student,  $P < 0.05$ ); ns, no significativo. En B, se analiza el diámetro de los nódulos generados en los distintos tratamientos. Se observa que el 50% de nódulos de las raíces silenciadas (barras rojas) poseen diámetros menores que los nódulos de plantas control (barras azules) a los tres tiempos post inoculación analizados; el tamaño máximo que alcanzan los mismos suele ser inferior al compararlos con el control. Los asteriscos representan el valor de significancia (Mann-Whitney test,  $P < 0.05$ ).

El análisis de la distribución porcentual de todos los nódulos (Figura 17) generados en las raíces de 10 plantas silenciadas y comparados con la distribución porcentual en raíces de 10 plantas control mostró una disminución en el diámetro en los nódulos: a los 7 dpi aproximadamente un 81 % de los nódulos generados en las raíces silenciadas mostraron diámetros menores a 1 mm, mientras que en el caso de los nódulos de raíces control aquellos con estas dimensiones comprendieron el 76 % del total. Esta diferencia se hizo más evidente a los 14 dpi, donde en las raíces silenciadas, los nódulos con diámetros iguales y por encima de 1 mm correspondieron al 33 % del total de los nódulos totales, mientras que, en raíces silenciadas, estos ocuparon el 46 % del total. Finalmente, a los 21 días también fue evidente tal diferencia, ya que sólo el 39 % de los

nódulos de las plantas silenciadas mostraron diámetros iguales o mayores que 1 mm, mientras que los nódulos con estas dimensiones en las raíces control conformaron el 48 % del total.

Estos resultados sugieren que la disminución en la acumulación de transcrito del gen *PvFER1*, provoca una ligera disminución en el número y diámetro de los nódulos generados.



**Figura 17. Distribución porcentual en el número de nódulos en raíces silenciadas.** La gráfica representa la distribución de los diámetros de los nódulos contabilizados y medidos en raíces silenciadas a los 7, 14 y 21 dpi, los cuales se separaron por diámetros en 3 grupos: el primero grupo comprende los nódulos con diámetros por debajo de 0.4 mm (azul), en el segundo son nódulos con diámetros entre 0.4 mm y por debajo de 1 mm (naranja), el tercer grupo comprende los nódulos con diámetros mayores o iguales a 1 mm (gris). Los resultados mostrados corresponden a los nódulos generados en las raíces transgénicas de 15 plantas en total, correspondientes a tres replicas biológicas.

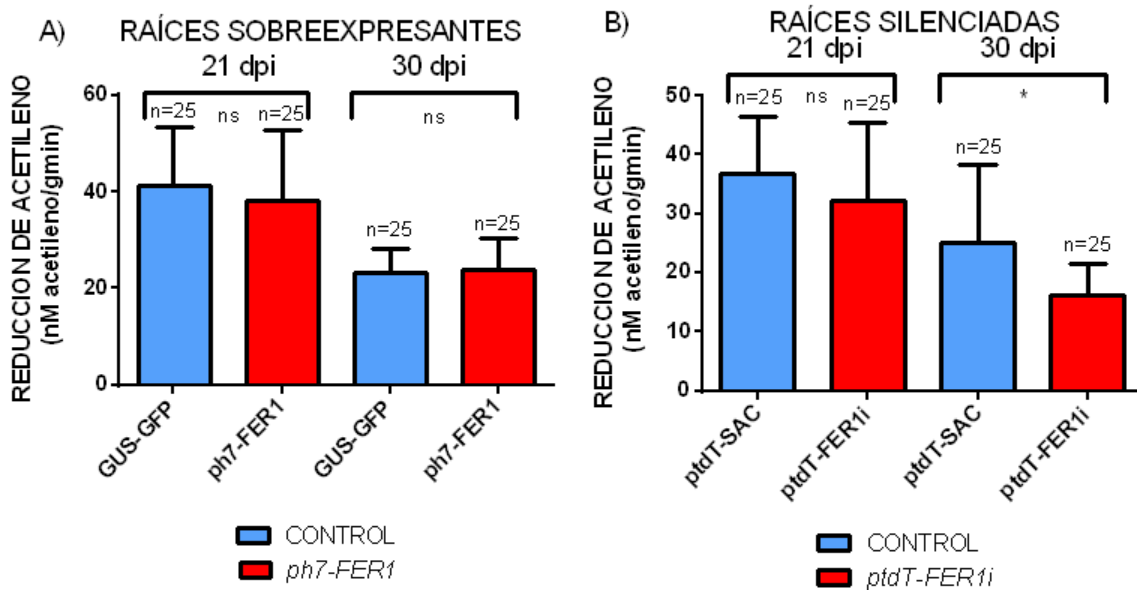
### 8.5.2 Reducción de acetileno

Con el objetivo de evaluar el efecto del silenciamiento de *PvFER1* en la actividad de la nitrogenasa en nódulos en raíces transgénicas de frijol, se inocularon éstas con *R. tropici* y se midió la reducción de acetileno a los 21 dpi y 30 dpi, que corresponden a las etapas a las cuales se tiene la máxima tasa de fijación de nitrógeno y la etapa de senescencia en nódulos de frijol, respectivamente.

Para medir el efecto de la sobreexpresión de *PvFER1* en la fijación de nitrógeno, se inocularon raíces transgénicas con *R. tropici* y se midió la reducción de acetileno a los 21 y 30 dpi. De acuerdo

a los resultados de este análisis (Figura 18A) no se observó una diferencia en la reducción de acetileno en los nódulos de las raíces sobreexpresantes de *PvFER1* a los 21 y 30 dpi respecto a los nódulos de raíces control.

En el caso del efecto del silenciamiento de *PvFER1*, se observa que a los 21 dpi no hubo una diferencia significativa en la reducción de acetileno en nódulos de plantas silenciadas respecto al control, sin embargo, a los 30 dpi se observó una disminución en el nivel de fijación de nitrógeno en nódulos de las raíces silenciadas mayor que la disminución observada en los nódulos de las raíces control (Figura 18A).



**Figura 18. Análisis de la reducción de acetileno en raíces transgénicas silenciadas y sobreexpresantes de *PvFER1*.** A) Actividad enzimática de la nitrogenasa en la prueba de reducción de acetileno en raíces sobreexpresantes del gen *PvFER1*, medida en nanomoles de etileno generados por gramo de nódulos por minuto. Se observa que no existe una diferencia significativa en la actividad de la enzima en raíces sobreexpresantes a los 21 dpi ni a los 30 dpi. B) Actividad enzimática de la nitrogenasa en raíces silenciadas en el gen *PvFER1*. A los 21 días post inoculación con *R. tropici* no se observa una diferencia en la actividad de la nitrogenasa en plantas con raíces transgénicas (ptdT-FER1i) silenciadas respecto al control (ptdT-SAC), sin embargo, se ve una disminución del 50 % en la actividad enzimática en nódulos de raíces silenciadas respecto al control. Las barras negras representan desviación estándar de los resultados de la reducción de acetileno de raíces de 25 plantas procedente de tres replicas técnicas (n=25). Los asteriscos representan el valor de significancia (t student,  $P < 0.05$ ); ns, no significativo.

## 9. DISCUSIÓN

Los receptores de membrana tipo cinasa (RLK) en plantas, conforman una familia génica con más de 600 miembros en *A. thaliana*. Son proteínas transmembranales con un dominio extracelular N-terminal variable, y un dominio intracelular cinasa de Serina-Treonina (Shiu and Bleecker, 2001). La clasificación de estos RLK se hace en base a la variabilidad de los dominios extracelulares. La subfamilia de receptores tipo cinasa CrRLK1L se caracterizan por poseer en el dominio extracelular, dos dominios con homología a los dominios de unión a carbohidratos de la proteína Malectina que es de origen animal (Malectin-like), un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático Tirosina-cinasa (Boison-Dernier *et al.*, 2011). En *A. thaliana*, la subfamilia CrRLK1L está compuesta por 17 miembros. En este trabajo, mediante un análisis *in silico*, se determinó que la subfamilia CrRLK1L en frijol está compuesta por 32 miembros, los cuales conservan los dos dominios Malectin-like, así como el dominio cinasa. Sin embargo, 3 de los miembros de la subfamilia de CrRLK1L de frijol no presentan dominio transmembranal de acuerdo al recurso bioinformático buscador de dominios de SMART (Simple Modular Architecture Research Tool).

FERONIA (FER), es un receptor de membrana perteneciente a la subfamilia CrRLK1L, presente de manera exclusiva y conservada en todas las plantas, y cuya participación se ha descrito en *A. thaliana* en varios procesos que van desde respuesta a fitohormonas (Guo *et al.*, 2009; Deslauries and Larsen 2010; Yu *et al.*, 2012), a la invasión fúngica (Kessler *et al.*, 2015), a la fertilidad (Escobar-Restrepo *et al.*, 2007) y en el metabolismo (Yang *et al.*, 2015). En pelos radicales, se ha descrito la participación de FER en el crecimiento polar; FER promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) originadas por NADPH oxidasas, a través de la activación de una RAC/ROC GTPasa, así como aumentos en los flujos de  $Ca^{2+}$  al citosol (Duan *et al.*, 2010). En *A. thaliana* sólo existe un gen que codifica FER (Escobar-Restrepo *et al.*, 2007), mientras que en frijol identificamos dos genes en base a su identidad con FER de *A. thaliana*: Phvul.008G081000 y Phvul.008G082400 (*PvFER1* y *PvFER2* respectivamente). La posible existencia de dos genes de FER en frijol resulta interesante ya que habla de un posible proceso de duplicación del gen y la conservación de ambas copias posiblemente por la gran importancia y la variedad de procesos en los cuales FER podría participar.

Los genes *PvFER1* y *PvFER2* se expresan principalmente en tallos y raíces de frijol de 17 dpj, pero también se expresa en hojas, aunque en nivel más bajo; esto concuerda con lo reportado anteriormente de que la expresión de FER ocurre en casi todos los tejidos de las plantas (Escobar-Restrepo *et al.*, 2007). Nuestro análisis demostró que existe una mayor acumulación de transcrito en pelos radicales de 2 dpj respecto a otras secciones de la raíz de frijol. Al comparar los niveles de acumulación de ambos transcritos, se observó que el transcrito *PvFER1* se acumula hasta 10 veces más que el transcrito *PvFER2*. Al comparar estos resultados con los niveles de expresión publicados en el transcriptoma de frijol por O'Rourke *et al.*, (2014), se observa que el mayor nivel de acumulación de ambos transcritos es en raíces, datos que concuerdan con los reportados en el transcriptoma de frijol. Sin embargo, en los datos del transcriptoma se aprecian niveles de acumulación de transcritos *PvFER1* y *PvFER2* similares en los diferentes tejidos y bajo las diferentes condiciones reportadas. Esta discrepancia puede deberse a que probablemente la técnica de RNAseq utilizada en la obtención del transcriptoma, entre *PvFER1* no se hizo con un nivel de profundidad tal que permitiera discriminar entre los niveles de ambos transcritos. Estos poseen un alto porcentaje de identidad a nivel secuencia de aminoácidos (94.4%) y por tanto los datos reportados en el transcriptoma pueden ser el reflejo de la suma de los niveles de los dos transcritos, mientras que en este trabajo se diseñaron oligonucleótidos que nos permitieron medir de manera específica los transcritos de cada uno de estos genes.

Dado que hay una variación en el patrón de acumulación del transcrito *PvFER1* en raíces de frijol 15 días posteriores a ser inoculadas (dpi) con *R. tropici* comparadas con plantas no inoculadas, esto hace suponer una posible participación de FER en el establecimiento de esta simbiosis. A los 5, 7, 9 y 15 dpi se obtienen niveles de acumulación del transcrito *PvFER1* superiores en plantas sin inocular respecto a las inoculadas, además en las plantas inoculadas no hay variación de los niveles en la acumulación de transcrito hasta los 15 dpi, respecto a los niveles encontrados a los 3 dpi, mientras que en las raíces que no fueron inoculadas se observa un aumento progresivo en los niveles de acumulación. Estos resultados son muy interesantes ya que no hay reportes previos donde se relacione a FER en el establecimiento de simbiosis con rhizobia. Si bien se han descrito aumentos en los niveles de transcrito de FER en estrés biótico mediante microarreglos (Hruz *et al.*, 2008), así como aumentos en los niveles de transcrito de FER durante la inoculación con *R. tropici* y en nódulos efectivos por RNAseq (O'Rourke *et al.*, 2014), y la participación de FER



durante una infección fúngica (Kessler *et al.*, 2010). A la fecha no existen reportes donde se estudie el papel de FER durante el establecimiento de la simbiosis entre una leguminosa y rhizobia.

Los estudios realizados en este proyecto nos permitieron analizar la participación de *PvFER1* en la determinación de la cantidad y el diámetro de nódulos. La alteración en los niveles normales de expresión de *PvFER1* en raíces de frijol altera el número de nódulos que generan las plantas: plantas con raíces sobreexpresantes de *PvFER1* muestran un incremento en el número de nódulos generados, mientras que en plantas con raíces silenciadas en *PvFER1* se observa una disminución en el número de nódulos. Esta variación en el número de nódulos obtenidos puede estar relacionado con el papel que juega FER en el desarrollo de los pelos radicales reportado por Duan *et al.*, (2010) en raíces de *A. thaliana*, donde describen que FER es necesario para que se lleve a cabo el crecimiento polar de los pelos radicales. Para determinar si la variación en el número de nódulos está relacionada con un fenotipo similar de FER a nivel de pelos radicales en frijol o si es debido a un papel de FER en la organogénesis del nódulo, es necesario evaluar el efecto del silenciamiento y la sobreexpresión de *PvFER1* en el desarrollo de los pelos radicales en raíces transgénicas de frijol. Por otro lado, Montiel *et al.*, (2008), determinaron en frijol la participación de una NADPH oxidasa (RbohB) en el desarrollo de nódulos; en plantas de frijol silenciadas en el gen *PvRbohB* hay una disminución en el número de nódulos debido a que la progresión del hilo de infección se detiene en la base del pelo radical. De acuerdo al modelo de la participación de FER en el crecimiento polar, FER regula la generación de EOR a través de una RBOH (Duan *et al.* 2010), por esto sería interesante observar si FER tiene un papel directo en la progresión del hilo de infección, como en el caso de esta RbohB (Montiel *et al.*, 2008), evaluando el avance del hilo de infección en las raíces sobreexpresantes y silenciadas en el gen *PvFER1*, y así correlacionarlo con los resultados observados en este trabajo.

La alteración en los niveles normales de expresión de *PvFER1* en raíces de frijol, tanto el aumento como la disminución del nivel del transcrito, parecen provocar una disminución en el diámetro de los nódulos. Combier *et al.*, (2008) reportaron en *M. truncatula*, que la sobreexpresión de RALF1, uno de los ligandos de FER, provoca el desarrollo anormal de nódulos, así como un incremento en el número de hilos de infección abortados en la base del pelo radical. En este trabajo observamos un aumento en la acumulación del transcrito *PvFER1* en raíces sobreexpresantes de tan sólo 5 veces respecto a las raíces control, mientras que en *M. truncatula*, Combier *et al.*, reportaron un

incremento en la acumulación del transcrito de *ralfl* en las raíces sobreexpresantes de RALF1 de 32 veces respecto a las condiciones control. Esta diferencia tan marcada en la sobreexpresión de RALF1 respecto a FER, podría estar reflejando un fenotipo más penetrante que el observado en este trabajo, así mismo, no puede descartarse que esté involucrado algún otro receptor de RALF1, y sea a través de este que observamos el fenotipo reportado por Combier *et al.* Además, al tratarse de modelos distintos (el frijol genera nódulos determinados mientras que *M. truncatula* genera nódulos indeterminados), podríamos estar observando un mecanismo que funciona de manera diferente para ambos modelos.

Por otro lado, el reporte reciente de la existencia de un correceptor de FER, llamado LLG (por sus siglas LORELEI LIKE GPI ANCHORED PROTEIN) que es necesario para la localización de FER en la membrana plasmática, así como para su correcto funcionamiento (Li *et al.*, 2015) nos hace pensar que el fenotipo menos penetrante observado en las raíces sobreexpresantes de *PvFER1* se debe a que no hay una localización en la membrana celular de todo el receptor de FER que pudiera estarse sintetizando, o que el co-receptor es limitante de la actividad de FER a pesar de ubicarse en el lugar adecuado. Para comprobar alguna de estas hipótesis es necesario observar por microscopía la localización de FER-GFP en las raíces sobreexpresantes de frijol.

El hecho de observar un fenotipo en el número y el diámetro de los nódulos en las raíces transgénicas sobreexpresantes al comparar con las raíces control, puede estar relacionado con problemas en la formación de un nódulo maduro efectivo, ya sea a nivel infección o diferenciación de la bacteria, por tanto, se decidió medir la actividad de la nitrogenasa. En este sentido, no observamos diferencias evidentes en la reducción de acetileno en raíces de frijol silenciadas ni sobreexpresantes de *PvFER1*. El aumento o la disminución de este transcrito no parece tener un efecto en el desarrollo de un nódulo maduro ni durante la fijación de nitrógeno, sin embargo, para confirmar esto, es necesario realizar cortes histológicos de los nódulos de raíces sobreexpresantes o silenciadas a diferentes tiempos de desarrollo para apreciar si la infección y diferenciación de la bacteria se está llevando adecuadamente.

Estos resultados observados en la actividad de la nitrogenasa, permiten desestimar un retraso en el desarrollo de los nódulos, ya que la actividad específica parece decrecer al mismo ritmo en nódulos de raíces sobreexpresantes o silenciados en *PvFER1*, que en condiciones de acumulación de

transcrito normales a los 30 dpi, momento en el cual comienza a observarse la senescencia de los nódulos en raíces de frijol. Montiel *et al.*, (2008), determinaron que el silenciamiento de *PvRbohB* provoca una disminución de la reducción de acetileno de los nódulos que se formaron. Si FER está teniendo un efecto similar a través de la modulación de la activación de una NADPH oxidasa (como sucede en el desarrollo de los pelos radicales, Duan *et al.*, 2010), este no fue evidente en este trabajo, y para determinarlo se requieren realizar estudios que nos permitan evaluar el fenotipo de las raíces silenciadas o sobreexpresantes de *PvFER1* en frijol, como el análisis de la producción de EOR en las raíces transgénicas.

En base a todos los resultados obtenidos, proponemos que FER tiene un papel en la simbiosis, posiblemente en las etapas más tempranas, ya que los efectos de la modificación de los niveles de este transcrito muestran un fenotipo de FER en al menos las etapas tempranas de desarrollo de los nódulos, provocando una disminución en su número y diámetro. Sin embargo, a pesar de tener diámetros inferiores, los nódulos de raíces silenciadas y sobreexpresantes son funcionales, con actividad específica de la nitrogenasa similar a las plantas control, descartando aparentemente una participación de FER en el proceso de fijación de nitrógeno.

## 10. CONCLUSIONES

- En frijol, la subfamilia de receptores CrRLK1L está compuesta por 32 miembros en frijol, todas conservan los dominios de unión de carbohidratos (“Malectin-Like”) y el dominio cinasa.
- En frijol existen dos copias del gen FER (*PvFER1* Y *PvFER2*), las cuales poseen los dominios extracelulares “Malectin-Like” y el dominio citoplasmático cinasa.
- El nivel de acumulación del transcrito *PvFER1* es hasta 10 veces mayor que el nivel de acumulación del transcrito *PvFER2* en raíces WT sin inocular.
- El perfil de acumulación de transcrito *PvFER1* se modifica en raíces de frijol inoculadas con rhizobia, al compararlas con raíces no inoculadas.
- Las raíces transgénicas sobreexpresantes de *PvFER1* muestran un incremento en el número de nódulos y una disminución en el diámetro de estos.
- Las raíces transgénicas silenciadas en *PvFER1* presentan una disminución del número de nódulos que generan y una disminución en el diámetro de los mismos.
- La modificación en los niveles de expresión del gen *PvFER1* (debida a la sobreexpresión o al silenciamiento) en raíces transgénicas de frijol no tiene efecto sobre la actividad de la nitrogenasa ni a los 21 ni a los 30 dpi.
- En base a estos resultados concluimos que *PvFER1* juega un papel fundamental en los eventos tempranos de la endosimbiosis, como puede ser durante el establecimiento del primordio del nódulo (por el fenotipo observado en los diámetros) o durante la formación de eventos de infección (por el fenotipo observado en el número), sin embargo, no participa en la funcionalidad de los nódulos (por la ausencia de fenotipo en la actividad de la nitrogenasa). Para establecer exactamente en qué punto y en qué proceso está participando se requiere de más experimentos.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Aebi, M.**, (2013) N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2430-2437.
- Arthikala, MK, Sanchez-Lopez, R, Nava, N, Santana, O, Cardenas, L, and Quinto, C.** (2014). RbohB, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *The New phytologist* **202**, 886-900.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunack S.**, (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 4(6), 1633-1649.
- Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kristas, K., Grobei, M.A., Jaciubeck, M., Schroeder, J.I., and Grossniklaus, U.** (2009). Disruption of the pollen expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge. *Development*. **136**:2379-3288.
- Boisson-Dernier, A., Kessler, S.A., and Grossniklaus, U.** (2011). The walls have ears: the role of plant CrRLK1Ls in sensing and transducing. *J. Experimental Botany*. **62**(5):1581-1591.
- Boisson-Dernier, A., Lituiev, D.S., Nestorova, A., Franck, C.M., Thirugnanarajah, S., and Grossniklaus, U.** (2013). ANXUR receptor like-kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. *PLoS Biol.* **11**: e1001719.
- Broughton, W.J., and Dilworth, M.J.**, (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* **125**(4):1075-1080.
- Burris R.H.** (1972). Nitrogen Fixation: Assay methods and techniques. *Methods in Enzymology*. 24:415-431.
- Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, T.L., Sanchez, F., Quinto, C., Feijo, J.A., Kunkel, J.G., and Hepler, P.K.** (2000). Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant physiology* **123**, 443-452.

- Cárdenas, L., Martínez, A., Sanchez, F., and Quinto, C.,** (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J.* **56**, 802-813.
- Castresana, J.,** (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 540-552.
- Combiér, J.P., Kuster, H., Journet, E.P., Hohnjec, N., Gamas, P., and Niebel, A.,** (2008) Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALFL1 and MtDVL1. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 1118–1127.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N.,** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* **162**(1):156-159.
- Dereeper, A., Audic, S., Claverie. J.M., and Blanc, G.,** (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology* 10:8
- Deslauriers, SD. and Larsen, P.B.** (2010) FERONIA is a key modulator of brassinosteroid and ethylene responsiveness in *Arabidopsis* hypocotyls. *Molecular Plant*, **3**:626-640.
- Duan, Q., Kita, D., Li, C., Cheung, A.Y., and Wu, H.M.** (2010). FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 17821-17826.
- Escobar-Restrepo, J.M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.C., and Grossniklaus, U.** (2007). The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science* **317**, 656-660.
- Ferguson, B.J., Idrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H. Lin, Y.H., Red, D.E., and Gesshhoﬀ, P.** (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Jour. Int. Plant Biot.* **52**(1), 61-76
- Gage, Daniel J.** (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**(2), 280-300.

- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.G., Toyota, M., Devireddy, A.R., and Mittler R.,** (2013). A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science*. **19(10)**, 623-630.
- Goodstein D.M., Shu, S., Howson R., Neupane R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., and Rokhsar D.S.,** (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, *Nucleic Acids Res.* **40** (D1): D1178-D1186.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O.** (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. **59(3)**:307-321.
- Guo, H., Li, L., Ye, H., Yu, X., Algreen, A., and Yin, Y.** (2009). Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 7648-7653.
- Hardy, R.W., Holsten, R.D., Jackson, E.K., and Burns R.C.,** (1968). The Acetylene-Ethylene Assay for N<sub>2</sub> Fixation: Laboratory and Field Evaluation. *Plant Physiol.* **43**:1185-1207.
- Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B. and Sussma, M.R.** (2014) A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion. *Science* **343**, 408-411
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuer S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W., and Zimmermann P.** (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinform.* **2008**:420747.
- Iden, S., and Collard, J. G.** (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cellpolarization. *Nature* **9**, 846-859.
- Jones, M.A., Raymond, M.J., Yang, Z., and Smirnov, N.** (2007) NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *J Exp Bot.* **58**:1261-70.
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker A.,** (2002). Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation.

- Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, Wuest SE, Ingram G, Panstruga R, Grossniklaus U.** (2010). Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science* **330**, 968–971.
- Kimura, S., Kaya, H., Kawarazaki, T., Hiraoka, G., Senzaki, E., Michikawa, M. and Kuchitsu, K.** (2012) Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 398–405.
- Lee, J.H., and Schoffl, F.,** (1997). GUS activity staining-a powerful tool in plant molecular biology. *Plant Mol. Biol.* **c5**:23-32.
- Li, S., and Zhang, Y.** (2014). To Grow or Not to Grow: FERONIA Has Her Say. *Molecular plant* **7**, 1261-1263.
- Li, S., Yeh F.L., Cheung A.Y., Duan Q., Kita D., Liu M.C., Maman J., Luu E. J., Wu B.W., Gates L., Jalal M., Kwong A., Carpenter H. and Wu H.M.,** (2015). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins as chaperones and co-receptors for FERONIA receptor kinase signaling in Arabidopsis. *eLife* **4**:e06587.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., and Lopez, R.,** (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acid Research.* **430**(w1):W580-4.
- Molendijk, A.J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C.S., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S. and Palme, K.** (2001). Arabidopsis thaliana ROP GTPases are localized to tip of roots and control polar growth. *EMBO J.* **20**:2779-2788.
- Montiel, J., Nava, N., Cardenas, L., Sanchez-Lopez, R., Arthikala, M.K., Santana, O., Sanchez, F., and Quinto, C.** (2012). A Phaseolus vulgaris NADPH oxidase gene is required for root infection by Rhizobia. *Plant & cell physiology* **53**, 1751-1767.



- O'Rourke, JA., Iniguez LP, Fu F, Bucciarelli B, Miller SS., Jackson SA., McClean PE., Li J., Dai X., Zhao PX., Hernandez G., and Vance PC.** (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics* **15**:866.
- Patriarca, E., Taté, R., Ferraioli, S. and Iaccarino, M.** (2004) Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology* **234**: 201-262
- Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J. and Ryan, C.A.** (2001) RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 12843–12847.
- Rae, A. L., Bonfante-Fasolo, P. and Brewin, N. J.** (1992). Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J.* **2**:385–395.
- Reyes, E., Padilla, B.L., Pérez O. y López, P.** (2008) Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Investigación científica.* **4**, 3
- Schultz G, Milpetz F., Bork P., and Ponting P.,** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 5857-5864.
- Shental-Bechor, D., and Levy Y.,** (2008) Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**(24):8256-8261.
- Shiu, S.H. and Beeckler, A.B.** (2001) Receptor-Like Kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**(19):10763-10768.
- Spiro, R.G.** (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* **12**(4):43R-56R
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A. and Mittler, R.** (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**(6):691-699.

- Talavera, G., and Castresana, J.** (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* **56**, 564-577.
- Udvardi, M. and Day, D.** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 493–523.
- Valdés-López, O., Arenas-Huertero, C., Ramírez, M., Girard, L., Sanchez, F., Vance, C.P., Reyes J.L., and Hernández G.,** (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvHPR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signaling in common bean roots. *Plant Cell & Environment*.**31**(12):1834-1843.
- Vincent J.M.,** (1970). *A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria*. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 164p.
- Wolf, S., and Hofte, H.** (2014). Growth Control: A Saga of Cell Walls, ROS, and Peptide Receptors. *The Plant Cell* **26**, 1848-1856.
- Wong, H.L., Pinontoan, R., Hayahi, K., Tabata, R., Yaeno, T., and Hasegawa, K.** (2007) Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* **19**: 4022–4034.
- Yang, T., Wang, L., Li C., Zhu S., Qi, Y., Liu, X., Lin Q., Luan S., and Yu F.** (2015). Receptor protein kinase FERONIA controls leaf starch accumulation by interacting with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Bioch Biop Res Comm.* **465**:77-82
- Yu, F., Qian, L., Nibau, C., Duan, Q., Kita D., Levasseur, K., Li X., Lu C., Li H., Hou C., Li L., Buchanan BB., Chen L., Cheung AY., Li d., and Luan S.** (2012). FERONIA receptor kinase pathway suppresses abscisic acid signaling in Arabidopsis by activating ABI2 phosphatase. *Proc Natl Acad Sci.* **106**(39):14693-14698.

## **12. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

### **PROTOCOLO PARA TINCION DE GUS (Lee and Schoffl, 1997).**

1. Colocar la raíz en una caja y sumergir en la solución i durante 5 minutos a temperatura ambiente (el volumen depende de la cantidad de raíz).
2. Retirar la solución i.
3. Sumergir las raíces en la solución ii durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar la solución ii.
5. Revelar la actividad de GUS sumergiendo en la solución iii. El tiempo varía dependiendo del experimento.
6. Lavar las raíces con agua estéril y desgasificar en el sistema de trampa de agua.
7. Aclarar las raíces en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% hasta retirar el color amarillo
8. Lavar las raíces 3 veces con agua estéril.

### **PROTOCOLO CON TRIZOL PARA EXTRACCIÓN DE RNA EN UN SOLO PASO, MODIFICADO DE CHOMCZYNSKI AND SACCHI, 1987.**

1. Macerar el tejido con ayuda de nitrógeno líquido, evitando que este se caliente.
2. Adicionar 1 mL de solución de TRIZOL al tejido macerado.
3. Mezclar por vortex durante 15 segundos y dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 200  $\mu$ L de cloroformo:isoamílico (24:1), mezclar por vortex e incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar durante 15 minutos a 11800 rpm a 4 °C.
6. Recuperar la fase superior en un nuevo tubo
7. Adicionar 1 volumen de isopropanol total e incubar 10 minutos a temperatura ambiente
8. Centrifugar durante 10 minutos a 5900 rpm a 4 °C.
9. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet en 1 volumen LiCl 4M.
10. Centrifugar durante 20 minutos a 5900 rpm a 4 °C.
11. Descartar todo el sobrenadante.
12. Resuspender el pellet en un volumen de buffer TE 1x a pH de 8.
13. Adicionar 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1) y mezclar por vortex.
14. Centrifugar durante 10 minutos a 5900 rpm a 4 °C.
15. Recuperar la fase superior en un tubo nuevo, agregar un volumen de isopropanol total y 66  $\mu$ L de acetato de sodio 3M a pH DE 5.2.
16. Mezclar por vortex y centrifugar durante 10 minutos a 11800 rpm a 4 °C.
17. Descartar el sobrenadante y secar completamente
18. Resuspender la pastilla en 50  $\mu$ L de agua DEPC.

**Tabla S1. SOLUCIONES PARA MEDIO B&D (Broughton and Dilworth, 1971).**

SOLUCIÓN	FÓRMULA QUÍMICA	CONCENTRACIÓN (μM)
<b>A</b>	CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	1000
<b>B</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500
<b>C</b>	Fe-citrato	10
<b>D</b>	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	250
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1000
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.2
	CoSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.1
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.1

\* Se mezcla 1 mL de cada solución para preparar 1 Litro de medio

**Tabla S2. SOLUCIONES PARA MEDIO FAHRAEUS (Vincent, 1970).**

SOLUCIÓN	FÓRMULA QUÍMICA	CONCENTRACIÓN (μM)
<b>1</b>	CaCl <sub>2</sub>	680
<b>2</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	734
<b>3</b>	Fe-citrato	18.5
<b>4</b>	MgSO <sub>4</sub>	468
<b>5</b>	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1042
<b>TRAZAS GIBSON</b>	MnSO <sub>4</sub>	12
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46
	ZnSO <sub>4</sub>	765
	CuSO <sub>4</sub>	320
	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	38

\* Se mezcla 1 mL de cada solución para preparar 1 Litro de medio

