



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIA BIOQUÍMICAS

Caracterización funcional del gen *PvFlap-II $\alpha$* , que codifica una fosfolipasa A tipo patatina de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), en la simbiosis con la rizobacteria *Rhizobium tropici*

## TESIS

Que para optar por el grado de

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LIC. RONAL PACHECO SANCHEZ

TUTOR PRINCIPAL:

MIBB. Ma. del Carmen M. Quinto H.

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Dra. Elizabeth Cordoba Martínez

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Otto Geiger

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

MAYO 2019



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.

## DEDICATORIA

*A mi madre y a mi gran amigo Luís Enrique Diez Avila (Paky) por su determinante y valiosa ayuda para poder salir adelante y cumplir con el ansiado objetivo de realizar un postgrado en una prestigiosa institución.*

Este proyecto de tesis se realizó en el Consorcio de Interacciones Mutualistas en Plantas dirigido por la MIBB. Ma. del Carmen M. Quinto H. y el Dr. Luis Cárdenas Torres, adscrito al Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Sistema Nacional de Investigadores (SNI) del CONACyT financiaron la beca de estancia durante el periodo de investigación y escritura de la tesis. También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la participación en el XIII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, organizado por el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba.

## AGRADECIMIENTOS

*A la MIBB. Carmen Quinto por darme la posibilidad de realizar la maestría bajo su asesoría, por sus sugerencias para llevar a cabo el proyecto, por su accesibilidad siempre que necesité de su atención y por la confianza depositada en mí para concluir el proyecto de tesis.*

*A los técnicos académicos Biol. Noreide Nava y Dr. Alfonso Leija y a la Dra. Yolanda Ortega por su gran apoyo en el laboratorio para la obtención de muchos de los resultados que forman parte de esta tesis.*

*Al Msc. Jorge Esaú Solís y al Dr. Maco Juárez por la colaboración y asesoría experimental y académica brindada durante la estancia en el laboratorio.*

*A la Dra. Citlali Fonseca por su gran asesoría en el manejo de las herramientas bioinformáticas, en especial por la ayuda con los análisis estadísticos de los resultados obtenidos y a su alumna Michelle Pérez por su ayuda con el cuidado de las plantas.*

*A la Dra. Georgina Estrada por sus atinados consejos y por la ayuda para la optimización de algunas técnicas experimentales.*

*A los miembros del comité tutor MIBB. Carmen Quinto, Dra. Elizabeth Cordoba y Dr. Otto Geiger por su asesoría, comentarios y sugerencias para mejoría del proyecto.*

*A los miembros del jurado Dra. Helena Porta, Dr. Damien Formey, Dr. Ángel Arturo Guevara, Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes y Dra. Cinthia Nuñez por sus oportunas correcciones y sugerencias.*

*¡A todos muchas gracias!*

## Resumen

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> son enzimas hidrolíticas de fosfolípidos que en plantas se clasifican como fosfolipasas A tipo patatinas (FLAp), por la presencia de un dominio patatina. Numerosos estudios han mostrado su función en respuesta a infección por patógenos, crecimiento vegetativo y elongación celular. Sin embargo, existen pocos estudios la función en la simbiosis entre plantas y microorganismos. En trabajos previos, por *RNA-seq*, se obtuvo el transcriptoma de raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con ganancia o pérdida de la función del gen *PvRbohB*, que codifica una NADPH oxidasa, en simbiosis con la bacteria *Rhizobium tropici* o con el hongo *Rhizophagus irregularis*. Mediante herramientas bioinformáticas, se identificaron los patrones de expresión de varios genes en dicho transcriptoma. Uno de estos genes (*PvFlap-IIα*), codifica una FLAp y este trabajo se enfoca en el estudio de su función en raíces transgénicas de frijol en simbiosis con *R. tropici*, mediante genética reversa.

A través de un análisis *in silico*, se demostró que en frijol las FLAp de frijol forman una familia multigénica de 21 miembros. Las FLAp de frijol están relacionadas filogenéticamente con las descritas en otras especies de plantas y se agrupan en cuatro clados. Los niveles de acumulación de los transcritos de *PvFlap-IIα* y de otros dos miembros de la familia (*PvFlap-IIβ* y *PvFlap-IIγ*), se cuantificaron en raíces sin inocular e inoculadas con *R. tropici*. En todos los tratamientos, *PvFlap-IIα* tuvo los mayores niveles de expresión en comparación con los otros genes. Los niveles de acumulación de los transcritos de *Pvflap-IIα* no fueron significativamente diferentes entre raíces no inoculadas e inoculadas en los primeros siete días posteriores a la inoculación (dpi). En raíces de 14 y 21 dpi, hubo diferencias estadísticas en la acumulación de transcritos entre los diferentes tratamientos. Particularmente, la expresión en nódulos de 14 y 21 dpi fue menor que en raíces completas y desnoduladas.

Con el objetivo de estudiar la participación de *PvFlap-IIα* en la simbiosis frijol-rizobios, se analizó el fenotipo de las raíces transgénicas inoculadas con la bacteria, con pérdida o ganancia de la función de *PvFlap-IIα*. De manera interesante, tanto las raíces con disminución como con ganancia de la expresión de *PvFlap-IIα* desarrollaron la misma cantidad de nódulos y tuvieron la misma tasa de fijación de nitrógeno a los 21 y 28 dpi. Estos resultados podrían deberse a que la disminución de la expresión de *PvFlap-IIα* no fue significativa en raíces de 21 y 28 dpi respecto al control, o a que otro miembro de la familia de *PvFlap* podría haber compensado la

función de *PvFlap-II $\alpha$* . Para una mejor comprensión de la función de las FLAp en la simbiosis leguminosa–rizobios, se considera necesario realizar más estudios con diferentes enfoques.

## Abstract

Phospholipases A<sub>2</sub> are hydrolytic enzymes of phospholipids, in plants they are identified as patatin-related phospholipases A (pPLA) since they have a patatin domain. Several studies have demonstrated their role in response to pathogens, vegetative growth and cellular elongation. However, the participation of pPLA in mutualistic plant-microbe interactions has been poorly explored. Previously, by RNA-seq, the transcriptomic analysis of *Phaseolus vulgaris* roots with loss or gain-of-function of *PvRbohB* gene, in symbiosis with the rhizobacteria *Rhizobium tropici* or with the arbuscular mycorrhizal fungi *Rhizophagus irregularis*, was performed. Using bioinformatic tools, the expression profile of several genes, from the transcriptome, was identified. One of these genes (*PvpPla-IIα*), encodes a pPLA; herein, the function of this gene was analyzed in common bean transgenic roots in symbiosis with *R. tropici*.

Analysis *in silico*, showed that common bean pPLA are encoded by a multigene family of 21 members. The common bean pPLA are phylogenetically related to those described in other plants and are clustered in to four clades. Quantitative analysis of transcript levels of *PvpPla-IIα* and two other members of the family (*PvpPla-IIβ* and *PvpPla-IIγ*), was performed in non-inoculated or inoculated roots with *R. tropici*. *PvpPla-IIα* had the highest expression levels in all treatments tested in relation to the other genes. Transcript levels of *PvpPla-IIα* did not show significant differences between non-inoculated and inoculated roots within the first 7 dpi. In roots of 14 and 21 dpi, the transcript accumulation of this gen was statistically different between treatments. Particularly, *PvpPla-IIα* expression level in nodules was lower than in whole and desnodulated roots.

In order to reveal the participation of *PvpPla-IIα* on rhizobial symbiosis, the phenotype of transgenic roots down-regulated or over-expressing this gene (*PvpPla-IIα*) after bacterial inoculation, were analyzed. Interestingly, roots with loss or gain-of-function of *PvpPla-IIα* developed the same number of nodules, as well as the same nitrogen fixation rate, either at 21 and at 28 dpi. These results could be due to the fact that the down-regulation of *PvpPla-IIα* was not substantial, respect to the control. On the other hand, other members of the *PvpPla* gene family may compensate the *PvpPla-IIα* function. Further studies are needed for better understanding of the effect of pPLA on rhizobial symbiosis.



<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
DEPC	Dietilpirocarbonato
EF 1 $\alpha$	Elongation Factor 1 $\alpha$
GFP	Green Fluorescent Protein
GFP–GUS	Green Fluorescent Protein–beta-glucuronidase
ESM	Error Estándar de la Media
pb	Pares de bases
<i>PvGEA</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> Gene Expression Atlas
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>sn</i>	Stereospecific numbering
TA	Temperatura Ambiente
TE	Tris–EDTA
UTR	Untranslated Region

## Índice

I) Introducción .....	10
1) Simbiosis leguminosas–rizobios. Mecanismos moleculares .....	10
2) Infección de las raíces por rizobios y formación de nódulos .....	11
3) Participación de las especies reactivas de oxígeno en la simbiosis frijol–rizobios .....	12
II) Antecedentes.....	14
1) Las NADPH oxidasas en plantas .....	14
2) Las Fosfolipasas en plantas.....	15
2.1) Fosfolipasas D.....	15
2.2) Fosfolipasas C.....	16
2.3) Las Fosfolipasas A .....	17
Justificación .....	21
Hipótesis .....	21
Objetivos .....	21
III) Materiales y Métodos .....	22
1) Análisis <i>in silico</i> de los genes que codifican FLAp en <i>P. vulgaris</i> .....	22
2) Cuantificación de los niveles de transcritos de los genes <i>PvFlap–II<math>\alpha</math></i> , <i>PvFlap–II<math>\beta</math></i> y <i>PvFlap–II<math>\gamma</math></i> .....	22
2.1) Obtención de material biológico.....	22
2.2) Extracción de ARNs y cuantificación de transcritos.....	23
3) Generación de las construcciones para la sobreexpresión y el silenciamiento.....	24
4) Obtención de plantas compuestas.....	24
5) Análisis del fenotipo de raíces sobreexpresantes o silenciadas en la expresión de <i>PvFlap–II<math>\alpha</math></i> .....	25
6) Análisis estadístico .....	25
IV) Resultados.....	27
1) Análisis <i>in silico</i> de los genes <i>PvFlap</i> .....	27
2) Cuantificación de transcritos de los genes <i>PvFlap–II<math>\alpha</math></i> , <i>PvFlap–II<math>\beta</math></i> y <i>PvFlap–II<math>\gamma</math></i> durante la nodulación .....	30
3) Construcciones para la sobreexpresión y el silenciamiento .....	32
4) Análisis del fenotipo de raíces con pérdida o ganancia de la expresión de <i>PvFlap–II<math>\alpha</math></i> . 34	
V) Discusión .....	37
VI) Conclusiones.....	42
VII) Perspectivas.....	42
VIII) Literatura citada.....	43
IX) Material suplementario .....	48

## **I) Introducción**

### **1) Simbiosis leguminosas–rizobios. Mecanismos moleculares**

Las leguminosas (Fabaceae) constituyen una de las familias de plantas más amplia (Martínez–Romero *et al.*, 2009) y sus miembros son capaces de establecer simbiosis con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno conocidas como rizobios (revisado por Wang *et al.*, 2012). El frijol común (*Phaseolus vulgaris*), la leguminosa más importante en la dieta humana (Broughton *et al.*, 2003), tiene la versatilidad de asociarse con diferentes especies de rizobios como: *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium lusitanum* y *Rhizobium tropici* (revisado por Muñoz–Azcarate *et al.*, 2017).

Aunque *P. vulgaris* es capaz de asociarse con varias especies de rizobios, existe un grado de especificidad en esta interacción que es determinado por componentes moleculares producidos por ambos simbioses. Entre las moléculas producidas por las bacterias, se conocen polisacáridos de la pared celular como exopolisacáridos y lipopolisacáridos, proteínas de secreción tipo I y III y los factores de nodulación (FN). Estos últimos son lipoquitooligosacáridos sintetizados por los genes *nod* de la bacteria, genes cuya expresión es activada por flavonoides exudados por la planta. Estos FN se consideran los principales componentes moleculares en la especificidad rizobios–hospedero (revisado por Muñoz–Azcarate *et al.*, 2017). Este intercambio de señales químicas, también llamado diálogo molecular, permite la infección de los pelos radicales por parte de las bacterias (revisado por Cooper, 2007).

Los pelos radicales perciben a los FN a través de receptores específicos, lo que activa una ruta de señalización en la que participan varias proteínas y mensajeros secundarios. Dado que los componentes de esta ruta están presentes también en la simbiosis micorrícica arbuscular, se le denomina vía simbiótica común (VSC). El primer grupo de proteínas de la VSC incluye un receptor tipo cinasa (SYMRK) y la enzima HMGR1 (hidroximetil glutaril CoA reductasa) que sintetiza mevalonato. Tanto SYMRK como HMGR1 interactúan con los receptores específicos de los FN, NFR1 y NFR5 (del inglés: Nod Factor Receptor), ubicados en la membrana del ápice de los pelos radicales. Por su parte, el mevalonato es un mensajero secundario cuya función en la VSC ha sido documentada (revisado por Oldroyd, 2013 y Genre y Russo, 2016).

Un segundo grupo de proteínas está compuesto por tres nucleoporinas (NUP133, NUP85 y NENA), una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  (MCA8) y los canales catiónicos POLUX y CASTOR, localizados en la membrana de la envoltura nuclear. La función de las nucleoporinas es esencial para el establecimiento de la simbiosis con rizobios y con hongos micorrízicos arbusculares, ya que, la disminución de su función produce un fenotipo severo en ambas simbiosis (Kanamori *et al.*, 2006, Saito *et al.*, 2007 y Goth *et al.*, 2010).

A través de las nucleoporinas pasa hacia el nucleoplasma un segundo mensajero, probablemente una proteína activada como consecuencia de la producción de mevalonato. Se presume, que este segundo mensajero activa un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (proteína no identificada aún) que permite el influjo de este ion desde el lumen de la envoltura nuclear hacia el nucleoplasma. Simultáneo al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , se postula que ocurre un eflujo de  $\text{K}^+$  a través de POLUX y CASTOR, lo que regula el balance de carga de la membrana nuclear. Además, también se activa la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  MCA8, ubicada en la membrana nuclear interna, que restablece los niveles de este ion en el nucleoplasma. Se ha propuesto que las nucleoporinas participan en el movimiento de otras proteínas desde la parte citosólica de la membrana nuclear hacia el interior del núcleo. Estos resultados constituyen evidencia de una posible función de las nucleoporinas en la activación de POLLUX, MCA8 y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (revisado por Genre y Russo, 2016).

El último grupo de proteínas de la VSC se localiza en el nucleoplasma y entre ellas están: una serina–treonina quinasa dependiente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CCaMK), la proteína CyCLOPS y los factores de transcripción NSP1 y NSP2. CCaMK se activa ya sea por unión directa de  $\text{Ca}^{2+}$  a un motivo en la región C–terminal o por unión del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. CyCLOPS es fosforilada y activada por CCaMK y activa la expresión de genes importantes en los procesos simbióticos, además, se cree que podría modificar a CCaMK. La regulación de la expresión génica por parte de CyCLOPS puede ser de manera directa, a través del promotor NIN (factor de transcripción), o mediante la acción de los factores de transcripción NSP1 y NSP2 (revisado por Oldroyd, 2013 y Genre y Russo, 2016).

## **2) Infección de las raíces por rizobios y formación de nódulos**

El proceso de infección ocurre generalmente a través del ápice de los pelos radicales, los cuales se curvan alrededor de las bacterias. Posteriormente, las bacterias proliferan y se forma la cámara de infección, a partir de la cual se inicia el

hilo de infección (HI). Este es una estructura tubular que se forma mediante un proceso de invaginación de la membrana citoplasmática, en el que se invierte el crecimiento del ápice del pelo radical. A través del HI las bacterias migran hacia la base del pelo y a las células corticales, las cuales experimentan una alta actividad mitótica que contribuye a la formación del primordio de nódulo. En algunas leguminosas la infección se inicia en zonas donde hay daño epidérmico, generalmente causado por emergencia de raíces laterales. En este caso, el HI se origina a partir de estas zonas de la epidermis y permite el acceso de las bacterias a las células corticales de la raíz (revisado por Oldroyd y Downie, 2008).

Las bacterias se liberan desde el HI hacia el interior de las células del nódulo, en estado de formación, mediante un proceso similar a la endocitosis. Posteriormente, quedan rodeadas por una membrana de origen vegetal, se diferencian en bacteroides y se origina el simbiosoma, el cual se considera un organelo especializado en la fijación de nitrógeno. Finalmente, en el interior de los nódulos, las bacterias diferenciadas en bacteroides, convierten el nitrógeno atmosférico en amonio, forma biológica asimilable para las plantas. Tanto el nitrógeno fijado por las bacterias como el carbono provisto por la planta se intercambian a través de la membrana del simbiosoma (revisado por Oldroyd y Downie, 2008 y por Wang *et al.*, 2012).

### **3) Participación de las especies reactivas de oxígeno en la simbiosis frijol-rizobios**

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son moléculas producidas principalmente por las enzimas NADPH oxidasas, más conocidas en plantas como RBOHs (del inglés: *Respiratory burst oxidase homologs*) (revisado por Suzuki *et al.*, 2011). Varios autores han documentado que los niveles de EROs aumentan en distintas etapas de la nodulación (Santos *et al.*, 2001). En plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), la producción de superóxido ( $O_2^-$ ) y de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se incrementa en respuesta a la infección por *Sinorhizobium meliloti*. La mayor producción de  $O_2^-$  ocurre en etapas tempranas de la nodulación, por ejemplo, en HI y nódulos de 9 dpi. Este aumento en la producción se mantiene en nódulos de 16 y 18 dpi, aunque con niveles más bajos que en las etapas tempranas. El aumento en la acumulación de  $H_2O_2$  ocurre en HI y en la pared celular de células infectadas del nódulo (Santos *et al.*, 2001).

Tanto en plantas de alfalfa como de chícharo (*Pisum sativum*), inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* o *Rhizobium leguminosarum*, respectivamente, hay un incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las paredes celulares y espacios intercelulares en el córtex. Además, también aumentan los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la superficie de las bacterias contenidas dentro de los HI (Rubio *et al.* 2004). En *Medicago truncatula*, el gen *MtRbohA*, que codifica una RBOH, se expresa seis veces más en nódulos que en raíces a las cinco semanas luego de la inoculación con *S. meliloti*. Sin embargo, a los 7 dpi, *MtRbohA* tiene niveles de expresión iguales en nódulos y raíces. Por otra parte, en pelos radicales de *P. vulgaris* ocurre un aumento de los niveles EROs, de manera transiente, entre 15 y 30 segundos después del tratamiento con FN (Cárdenas *et al.*, 2008).

## II) Antecedentes

### 1) Las NADPH oxidasas en plantas

Las NADPH oxidasas de plantas o RBOH son enzimas localizadas en la membrana plasmática y especializadas en la producción de EROs. Estas enzimas presentan, en el extremo C-terminal, un dominio transmembranal y un dominio funcional oxidasa encargado de la producción de superóxido. El extremo N-terminal contiene regiones regulatorias que incluyen motivos de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (manos EF) y dominios de fosforilación, los cuales son esenciales para la función oxidasa. Se ha reportado que existe una relación estrecha entre la producción de EROs y la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ . En esta relación funcional ocurre una retroalimentación positiva donde el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a los motivos EF y promueve la producción de EROs, que a su vez activan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (revisado por Suzuki *et al.*, 2011).

La primera RBOH oxidasa de plantas se identificó en arroz (*Oryza sativa*) y es codificada por el gen *OsrbohA*. Posteriormente se han descrito RBOHs en otras especies como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* (tomate), *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum* (tabaco) y *Solanum tuberosum* (papa) (revisado por Torres y Dangl, 2005). En una investigación realizada previamente en el grupo, en donde se llevó a cabo este trabajo, se identificaron nueve genes que codifican RBOHs en frijol común (*RbohA, B, C, D, E, F, G, H e I*). Particularmente, se observó una abundante acumulación de transcritos de *RbohB* en raíces, brotes y nódulos de plantas de frijol inoculadas con *R. tropici*. Además, el silenciamiento del gen *PvRbohB* detuvo el avance de los HI a nivel de células epidérmicas (Montiel *et al.*, 2012).

Otros resultados mostraron que la colonización de la raíz por *Rhizophagus irregularis* (hongo micorrízico arbuscular) se incrementa en plantas con disminución de la expresión de *PvRbohB* (Arthikala *et al.*, 2013). Contrariamente, la sobreexpresión de *PvRbohB* aumenta la producción de EROs, la formación de HI, la biomasa de nódulos y la fijación biológica de nitrógeno, así como la densidad y tamaño de los bacteroides. Por el contrario, la colonización por *R. irregularis* disminuye en las raíces que sobreexpresan a *PvRbohB* (Arthikala *et al.*, 2014). Conforme con estos resultados, se puede concluir que la *RbohB* de frijol actúa como regulador positivo de la nodulación y como regulador negativo de la micorrización.

En otro trabajo del grupo, sometido a publicación, (Fonseca-García, *et al.*, 2019) se obtuvo por *RNAseq*, el transcriptoma de raíces transgénicas de frijol 1) con ganancia

o 2) pérdida de función del gen *PvRbhoB* a los siete días de inoculación con *R. irregularis* o con *R. tropici* y de raíces no inoculadas. Posteriormente, mediante herramientas bioinformáticas, se identificaron los patrones de expresión de diferentes genes en raíces bajo las condiciones mencionadas. Específicamente, se observó que dos genes que codifican fosfolipasas A tipo patatina, tienen aumentada su expresión en raíces inoculadas con *R. tropici* que sobreexpresan a *PvRbohB*. Con el interés de ampliar los conocimientos sobre los mecanismos de regulación de la simbiosis frijol–rizobios, se seleccionó uno de los genes identificados (*PvFlap-IIα*), para el análisis de su función en la simbiosis *P. vulgaris*–*R. tropici*.

## **2) Las Fosfolipasas en plantas**

Las fosfolipasas son enzimas esenciales en la hidrólisis de fosfolípidos, por lo tanto, tienen una importante función en los mecanismos de señalización mediados por lípidos (Singh *et al.*, 2012). Estas enzimas se clasifican en los grupos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C y D de acuerdo con su actividad hidrolítica específica sobre diferentes enlaces de los fosfolípidos (Wang, 2001).

### **2.1) Fosfolipasas D**

Las fosfolipasas D (FLD) constituyen una familia de enzimas heterogénea con propiedades bioquímicas, regulatorias y estructurales distintivas. Estas enzimas hidrolizan fosfolípidos de membrana y generan ácido fosfatídico, un segundo mensajero que regula muchas funciones celulares y el grupo polar correspondiente. Además, se caracterizan por la presencia de del motivo catalítico HxKxxxxD (HKD) en copia simple o doble. En plantas, las FLD pueden ser clasificadas en dos subfamilias: las que presentan un dominio de unión a Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos (C2) y las que contienen dos dominios distintos de interacción con fosfolípidos (PX/PH: *phox homology/Pleckstrin Homology*). La familia de las FLD en plantas es más amplia que en otros organismos, por ejemplo, se han identificado 12 y 17 miembros en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, respectivamente, mientras que solo 2 en mamíferos y 1 en *Saccharomyces cerevisiae* (revisado por Wang, 2005 y Li *et al.*, 2007).

La actividad hidrolítica de las FLD se ha observado en la germinación, el envejecimiento, la senescencia y en varias condiciones de estrés como: frío, sequía, infección por patógenos y deficiencia de nutrientes (revisado por Wang, 2001). Varios autores han documentado la función de las FLD en la simbiosis leguminosa–rizobios; den Hartog *et al.* (2001) observaron que las FLD se activan por los FN.



Resultados de estudios con enfoque fisiológico en mutantes de *M. truncatula*, indicaron que las FLD actúan corriente abajo de los receptores de los FN y corriente arriba de CCaMK (Charron *et al.*, 2004). La inhibición de estas enzimas bloqueó la expresión del promotor de *ENOD11* (*pMtENOD11-GUS*). Además, Mas7, un agonista de los FN, indujo la expresión de *pMtENOD11-GUS* en mutantes del correceptor de los FN (DMI2), pero no en las mutantes de CCaMK (Charron *et al.*, 2004).

En un estudio en el que se trataron células en suspensión de alfalfa con FN, se observó un incremento en actividad de las FLD, sin embargo, no hubo evidencia de activación de FLD por elicitores (den Hartog *et al.*, 2003). A partir de estos resultados, se ha sugerido que la activación de las FLD es importante para discriminar entre patógenos y simbiontes. Con el conocimiento de que muchas de las FLD de plantas son activadas por  $Ca^{2+}$  y que el influjo de  $Ca^{2+}$  es una respuesta primaria a la percepción de FN, se piensa que la activación de la FLD puede ocurrir corriente abajo de dicho influjo inicial de  $Ca^{2+}$  (den Hartog *et al.*, 2003). Por otra parte, Wan *et al.* (2005) encontraron una FLD que se expresa de manera diferencial en pelos radicales de *Glycine max* en comparación con la raíz, luego de la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*.

## **2.2) Fosfolipasas C**

Las fosfolipasas C (FLC) hidrolizan el enlace éster entre el esqueleto de glicerol y el grupo fosfato de fosfolípidos y producen diacilglicerol (DAG) y el correspondiente grupo polar fosfatado. Acorde a la especificidad de sustrato y las funciones celulares, las FLC en plantas pueden ser divididas en tres grupos: a) las que hidrolizan fosfoinosítidos (FLC-FI), b) las no específicas que hidrolizan fosfolípidos comunes como fosfatidilcolina y c) las que hidrolizan glicosilfosfatidilinositol anclados sobre proteínas (revisado por Wang, 2001).

Particularmente, las FLC-FI hidrolizan fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y generan diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato, los cuales son segundos mensajeros que liberan  $Ca^{2+}$  y activan proteínas cinasas C, respectivamente. Acorde a la estructura y organización de dominios, las FLC-FI se clasifican en seis subfamilias  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\zeta$ . En plantas solo se encuentran las FLC-FI  $\zeta$ , que carecen del dominio PH (*Pleckstrin Homology*) y contienen los dominios catalíticos X y Y adyacentes a un dominio C2 de unión a lípidos (revisado por Munnik, 2014).

Se han identificado varios genes que codifican FLC en las plantas, en *A. thaliana*, *S. lycopersicum* y *O. sativa*, se han reportado nueve, seis y cuatro genes, respectivamente que codifican FLC. Estos genes se expresan diferencialmente en distintas células y tejidos durante diferentes estados de desarrollo de las plantas y en respuesta a estrés biótico y abiótico (revisado por Munnik, 2014).

Existen numerosas vías de señalización inducidas por estrés mediadas por las FLC (revisado por Cannone *et al.*, 2011). En plantas de tomate infectadas con el hongo patógeno *Cladosporium fulvum*, se requiere la función de algunas FLC para el desarrollo de la respuesta hipersensible y la resistencia a la infección (Vossen *et al.*, 2010). Por otra parte, en *A. thaliana*, D'Ambrosio *et al.* (2017) observaron que una de las FLC (PLC2) regula la producción de EROs. De igual manera, en *A. thaliana*, otra FLC (*AtPLC5*), tiene una función importante en el desarrollo de las raíces laterales y su sobreexpresión incrementa la tolerancia a estrés por sequía y produce enanismo de los pelos radicales (Zhang *et al.*, 2018).

Al igual que las FLD, la función de las FLC también está documentada en la simbiosis leguminosa–rizobios mediante estudios con enfoques fisiológicos. Pingret *et al.* (1998) observaron que la neomicina, un inhibidor de las FLC, bloquea la expresión de *ENOD12*, lo cual implica que las FLC están involucradas en la percepción de FN. También se ha visto que la neomicina inhibe la respuesta de los pelos radicales al tratamiento con FN (den Hartog *et al.*, 2001). Además, los resultados encontrados por Charron *et al.* (2004) indican, que al igual que las FLD, las FLC pueden regular funciones corriente abajo de los receptores de los FN y corriente arriba de CCaMK. Otros autores encontraron que la inhibición de FLC–IF impide el enroscamiento de pelos radicales y el inicio de la formación del hilo de infección (Peleg-Grossman *et al.*, 2007). Por otra parte, mutantes de un gen que codifica una FLC–IF en *M. truncatula*, desarrollaron nódulos con escasa diferenciación de bacterias a bacteroides y senescencia prematura (Bourcy *et al.*, 2012).

### **2.3) Las Fosfolipasas A**

Las fosfolipasas A (FLA) constituyen una superfamilia de hidrolasas de los enlaces ésteres de los glicerofosfolípidos en posición 1 o 2 (*sn1* y *sn2*, respectivamente, por sus siglas en inglés). Las FLA pueden hidrolizar específicamente en *sn1* (FLA<sub>1</sub>) o *sn2* (FLA<sub>2</sub>), pero también tener actividad hidrolítica en ambas posiciones (Scherer *et al.*, 2010). Compuestos biológicamente activos involucrados en varias rutas de

señalización intracelular, como la lisofosfatidilcolina y la lisofosfatidiletanolamina, son el resultado de la hidrólisis de las FLA (Ryu, 2004).

Con base a las propiedades biológicas y a la homología de secuencias, las FLA<sub>1</sub> se clasifican en FLA<sub>1</sub> que hidrolizan fosfatidilcolina y las que actúan sobre ácido fosfatídico (revisado por: Ryu, 2004). Según el mismo criterio, las FLA<sub>2</sub> de plantas, se clasifican en dos grupos: las secretoras de bajo peso molecular (FLA<sub>2s</sub>) y las tipo patatina (FLAp). Las FLA<sub>2s</sub> de plantas tienen baja similitud en sus secuencias con las FLA<sub>2s</sub> de animales, excepto en el tallo de unión a Ca<sup>2+</sup> (YGKYCGxxxxGC) y el motivo del sitio activo (DACCxxHDxC) (revisado por Lee *et al.*, 2005). Por su parte, las FLAp se caracterizan por la presencia de un motivo esterasa GTSTG y la secuencia de unión a aniones DGGGXRG en su centro catalítico. Además, presentan otros motivos conservados como SAAPtYF, DGGXXANN, SLGTGy YLRID/Q (Scherer *et al.*, 2010).

Varios ensayos *in vitro* han mostrado que las FLAp actúan como acilhidrolasas sobre distintos fosfolípidos y galactolípidos. En *Arabidopsis*, se observó la actividad hidrolítica sobre monogalactosildiacilglicerol, digalactosildiacilglicerol, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina y fosfatidilinositol (Rietz *et al.*, 2010). La actividad combinada de FLA<sub>1</sub> y FLA<sub>2</sub> de las FLAp de *Arabidopsis* también está documentada (Holk *et al.*, 2002). En *Vigna unguiculata*, se observó que la FLAp VUT1 tiene mayor actividad sobre galactolípidos que sobre fosfolípidos (Matos *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha reportado que la actividad de estas enzimas puede ser regulada por proteínas cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Rietz *et al.* (2010) observaron que las FLAp de *Arabidopsis* (*AtPLAIVA* y *AtPLAIVB*) aumentaron tres y dos veces, respectivamente, su actividad hidrolítica sobre fosfatidilcolina cuando se fosforilan.

Las FLAp se han identificado en varios géneros de plantas. En el genoma de *A. thaliana* se encontraron 10 genes que codifican FLAp, las cuales fueron clasificadas en tres grupos (I, II y III) según la estructura de cada gen y similitud de las secuencias aminoacídicas. Se observó que estas proteínas tienen actividad combinada de FLA<sub>1</sub> y FLA<sub>2</sub>. A diferencia de las patatinas de papa, que son proteínas vacuolares, las de *Arabidopsis* se localizan en el citosol o se asocian a la membrana citoplasmática o al retículo endoplasmático. Sin embargo, el único miembro del grupo I se localizó tanto en citosol como en cloroplastos (Holk *et al.*, 2002). En arroz, Liu *et al.* (2015) identificaron 21 miembros de FLAp que de acuerdo a la similitud de sus secuencias de aminoácidos con las de *A. thaliana*, se clasificaron en cinco

subfamilias. Otras especies vegetales en las que se han descrito FLAp son: *Vigna unguiculata*, *N. tabacum*, *Cucumis sativus* y *Oncidium Gower Ramsey* (*Oncidium Goldiana*\_ *Oncidium Guinea Gold*) (revisado por Li y Wang, 2014).

Diferentes trabajos han documentado la función de FLAp en los mecanismos de defensa contra patógenos, resistencia a estrés hídrico y crecimiento vegetativo y de tejidos reproductivos. En hojas de tabaco infectadas con *Tobacco mosaic virus*, hubo un aumento en la acumulación de los transcritos de tres genes que codifican FLAp. Además, hubo un incremento en la actividad de FLAp solubles, seguido de la acumulación de ácido jasmónico y ácido 12-oxofitodienoico, los cuales participan en la respuesta a defensa (Dhondt *et al.*, 2000).

En experimentos realizados en *Arabidopsis* por La Camera *et al.* (2005), se observó que el silenciamiento del gen *PLP2* (*patatin-like protein*) indujo resistencia a la infección por el hongo *Botrytis cinerea* y a la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*avrRpt2*). Por el contrario, la sobreexpresión de *PLP2* causó mayor sensibilidad a la infección por el hongo y hubo proliferación de la bacteria avirulenta a niveles similares a los alcanzados por bacterias virulentas. Los resultados de este mismo trabajo también indicaron que la acumulación de PLP2 en respuesta a ambos patógenos es dependiente de la señalización por ácido jasmónico y etileno.

Las FLAp también están involucradas en mecanismos de respuesta a sequía, Matos *et al.* (2001) identificaron secuencias de unión a proteínas inducidas por estrés hídrico y ABA en la región promotora del gen *Vupat1*, que codifica una FLAp de *V. unguiculata*. Además, sus resultados mostraron un aumento en la expresión de *Vupat1* por estrés hídrico y que este efecto es mayor en un cultivar sensible a sequía que en uno resistente.

La función de las FLAp en el crecimiento de tejidos también se ha estudiado. La sobreexpresión de una FLAp de arroz (*OspPLAIII $\alpha$* ) provocó disminución de la longitud de tallos, raíces, hojas, semillas y panículas. Esto indica que *OspPLAIII $\alpha$*  tiene un efecto significativo en el crecimiento de tejidos vegetativos y reproductivos (Liu *et al.*, 2015). En *Arabidopsis* se vio que las plantas mutantes nulas (*AtplaIVA-null*) tenían reducción del desarrollo de raíces laterales, lo cual es característico de la incapacidad de respuesta a auxinas. Por su parte, *AtPLAIVC*, la cual es específica de gineceo, mostró expresión en raíces tratadas por ABA o deficiencia de fosfatos. Además, plantas mutantes (*AtplaIVC-1*) mostraron incapacidad de respuesta a la

deficiencia de fosfatos durante el desarrollo de la raíz, e interesantemente, desarrollaron hipocótilos más largos que las silvestres (Rietz *et al.*, 2010).

La función de las FLAp en las relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos es un área poco estudiada. En este contexto, se ha probado que extractos de fosfolípidos de raíces micorrizadas inducen la actividad del promotor de un transportador de fosfato de papa (*StPT3*). Estos extractos también indujeron la acumulación de transcritos de *LePT4*, que codifica para un transportador de fosfatos de células del córtex en tomate, normalmente inducido por la micorrización. El análisis de los componentes de estos extractos lipídicos permitió identificar la lisofosfatidilcolina, un producto de actividad hidrolítica de las FLAp, como el inductor de la expresión de los transportadores de fosfatos (Drissner *et al.*, 2007). Sin embargo, a la fecha, no se conoce ningún trabajo relacionado con la función de las FLAp en la simbiosis de las leguminosas con rizobios y esta es una de las razones por las que elegimos estudiar este tema.

## **Justificación**

Dada la escasa información en relación con la función de las FLAp en la simbiosis frijol–rizobios, los resultados que se obtengan generarán conocimiento de frontera en el área de estudio.

## **Hipótesis**

El gen *PvFlap-II $\alpha$*  tiene un efecto regulatorio positivo sobre la simbiosis de frijol con *R. tropici*.

## **Objetivos**

**Objetivo general:** Caracterización funcional del gen *PvFlap-II $\alpha$*  en la simbiosis *R. tropici*–*P. vulgaris*, mediante genética reversa.

### **Objetivos específicos:**

- Identificar los genes que codifican para FLAp en *P. vulgaris* y analizar la secuencia de aminoácidos de estas proteínas mediante herramientas bioinformáticas.
- Clasificar las FLAp de *P. vulgaris* mediante análisis filogenético.
- Cuantificar los niveles de transcritos de los genes *PvFlap-II $\alpha$* , *PvFlapII- $\beta$*  y *PvFlap-II $\gamma$*  en raíces silvestres de *P. vulgaris* en diferentes etapas de la nodulación.
- Analizar el fenotipo de raíces transgénicas con pérdida o ganancia de la función del gen *PvFlap-II $\alpha$* , durante la simbiosis con *R. tropici*.

### III) Materiales y Métodos

#### 1) Análisis *in silico* de los genes que codifican FLAp en *P. vulgaris*

Mediante un alineamiento de en el genoma de frijol V2.1 *Phytozome* 12.1.4 (Goodstein *et al.*, 2012), se identificaron los genes con alta identidad de secuencia con el gen *PvFlap-II $\alpha$*  (Phvul.001G020200.1) cuya secuencia se usó como sonda. Para ello se empleó la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool (BLASTP)*. Para investigar la presencia de dominios conservados y péptido señal en las FLAp de frijol, se emplearon las herramientas bioinformáticas *SMART (Simple Molecular Architecture Research Tool)* (Letunic y Bork, 2017) y *SignalP 5.0* (Nielsen, 2017), respectivamente.

Con las secuencias de aminoácidos de dos FLAp de *Sinorhizobium meliloti* (WP\_012477222.1 y WP\_088200843.1) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), las descritas en *A. thaliana* (Holk *et al.*, 2002) y *O. sativa* (Liu *et al.*, 2015) y las identificadas en *P. vulgaris*, se realizó un análisis filogenético. El árbol filogenético se construyó con el software *Mega 7.0.26* mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo LG. Como secuencia externa se usó la de una fosfolipasa A<sub>2</sub> independiente de Ca<sup>2+</sup> de humano (XP\_011514576.1, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). Finalmente se analizaron los perfiles de expresión de los genes *PvFlap-II $\alpha$*  y *PvFlap-II $\beta$*  en el atlas de expresión génica de *P. vulgaris* (*PvGEA*) (O'Rourke *et al.*, 2014).

#### 2) Cuantificación de los niveles de transcritos de los genes *PvFlap-II $\alpha$* , *PvFlap-II $\beta$* y *PvFlap-II $\gamma$*

##### 2.1) Obtención de material biológico

Siguiendo el protocolo de Estrada-Navarrete (2007), se esterilizaron semillas de frijol *P. vulgaris* (var. Negro Jamapa) y se germinaron durante 48 horas a 27°C sobre papel toalla humedecido con medio Fahraeus (Tabla S1; Vincent, 1970). Las semillas germinadas se pusieron en macetas con vermiculita como sustrato y se incubaron en cámara de cultivo a 28°C. La mitad de las semillas se inocularon con *R. tropici* (CIAT 899) (DO $\geq$  0,05) para generar la nodulación en las raíces y la otra mitad no se inoculó para obtener raíces de plantas control (no inoculadas). Se hicieron tres réplicas biológicas con ocho tratamientos divididos en dos etapas y se incluyeron cinco plantas por tratamiento (Tabla 1). Las plantas inoculadas se regaron con medio Fahraeus (Tabla S1; Vincent, 1970) y las no inoculadas con medio Fahraeus enriquecido con 10 mM [KNO<sub>3</sub>/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] para evitar la nodulación. Al

cabo de los 3, 5, 7, 14 y 21 días de haberse puesto las semillas en la cámara de cultivo, se colectaron las raíces para la extracción de ARNs totales.

Tabla 1. Tratamientos realizados en cada réplica biológica, por etapas, a partir de los cuales se obtuvo el material biológico (raíces) para la extracción de ARNs totales. SB: sin bacteria, CB: con bacteria, Comp: raíz completa (incluidos los nódulos), Rdes: raíz desnodulada, Nod: solo nódulos. 3, 5, 7, 14 y 21: días posteriores al inicio del experimento en los que se colectaron las raíces.

	Etapa I (periodos tempranos)		Etapa II (periodos tardíos)			
	Tratamientos	3SB	3CB	14SB	14Comp	14Rdes
5SB		5CB	21SB	21Comp	21Rdes	14Nod
7SB		7CB				

## 2.2) Extracción de ARNs y cuantificación de transcritos

La extracción de ARNs de raíces silvestres de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* o no inoculadas (control), se hizo mediante el protocolo de extracción con TRIzol (Chomczynski y Sacchi, 1987) con modificaciones (ver material suplementario: protocolo suplementario S1). Se cuantificó la acumulación de transcritos de los genes *PvFlap-II $\alpha$* , *II $\beta$*  y *Ily* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) con el uso de oligonucleótidos específicos (Tabla 2) y el fluoróforo *SYBR green* (*Thermo Scientific*).

Con la secuencia de cada oligonucleótido se realizó un alineamiento en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para corroborar su especificidad. La ocurrencia de dimerización entre cada pareja de oligonucleótido se descartó mediante un ensayo de qPCR. Para la normalización de los valores de la acumulación de transcritos, se usó como referencia los valores de expresión del factor de elongación de expresión constitutiva *EF1 $\alpha$* . En cada ensayo de qPCR se hicieron tres réplicas técnicas de la misma muestra.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para cuantificación de los genes *PvFlap-II $\alpha$*  y *PvFlap-II $\beta$*  y *PvFlap-Ily*

Oligonucleótidos	Secuencia	Amplicón
qFw200.1/qRv200.1 ( <i>PvFlap-II<math>\alpha</math></i> )	5'CGAGGCCAGATTTGAACGGGTT/ ACCACCATCTATTAGGTCAAAGTTGCC 3'	140 pb
qFw100.1/qRv100.1 ( <i>PvFlap-II<math>\beta</math></i> )	5'AGTGTCCCTGCAATATTCCTTCATGTGG/ CCCCTGCACTTTGAAGGGAGAA 3'	106 pb
qFw20300/qRv20300 ( <i>PvFlap-Ily</i> )	5'AGGAGTTGGATGGTCCAGAGG/ GTCAGGAGCAGTTAGCATGGCT 3'	101 pb



### **3) Generación de las construcciones para la sobreexpresión y el silenciamiento**

La construcción para la sobreexpresión del gen *PvFlap-II $\alpha$*  (*35S:PvFlap-II $\alpha$ -GFP*) se obtuvo a partir de su región codificadora, la cual fue insertada en el vector de clonación *pENTR/D-TOPO*. Mediante el sistema de clonación *Gateway* (*Invitrogen*) y la enzima LR clonasa, se introdujo dicho fragmento en el vector binario *pH7FWG2D* (Karimi *et al.*, 2002), en el que su expresión queda regulada por el promotor 35SCamV. Este vector tiene fusionada la secuencia del gen de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés), lo que permite identificar las raíces transgénicas portadoras de la construcción, mediante microscopía de epifluorescencia. Basado en el mismo procedimiento se generó la construcción para la sobreexpresión del gen *PvFlap-II $\gamma$*  (*35S:PvFlap-II $\gamma$ -GFP*). La construcción *35S:GFP-GUS* se usó como control.

Para generar las construcciones para el silenciamiento de *PvFlap-II $\alpha$*  y *PvFlap-II $\gamma$* , un fragmento de 103 pb de la región 3'UTR de *PvFlap-II $\alpha$*  y otro de 131 pb correspondiente a las regiones 5'UTR y codificadora de *PvFlap-II $\gamma$* , se insertaron de manera independiente en el vector *pENTR/D-TOPO*. En ambos casos, mediante la tecnología *Gateway* (*Invitrogen*) y la enzima LR clonasa, el fragmento correspondiente a cada gen se movilizó al vector binario *pTdT-DC-RNAi* (Valdez-López *et al.*, 2008). En este vector, quedan insertadas dos copias del fragmento movilizado, en sentido inverso y separadas por una secuencia de 424 pb que forma una estructura tipo asa. Esta estructura permite la formación de ARNs de interferencia (RNAi, por sus siglas en inglés) necesarios para el silenciamiento génico postranscripcional. El vector *pTdT-DC-RNAi* cuenta con la proteína roja fluorescente (tdTomato) como reportera. Como control se usó el vector *pTdT-DC-SAC*.

### **4) Obtención de plantas compuestas**

Mediante el método de Estrada-Navarrete *et al.* (2007) (con algunas modificaciones) y con el uso de la cepa *Agrobacterium rhizogenes* K599, portadora de las construcciones para la sobreexpresión (*35S:PvFlap-II $\alpha$ -GFP*) o para el silenciamiento (*pTdT-DC-PvFlap-II $\alpha$ -RNAi* y *pTdT-DC-PvFlap-II $\gamma$ -RNAi*), se generaron raíces transgénicas (plantas compuestas). Las modificaciones del protocolo se realizaron en los pasos 8 y 9, ya que, las semillas germinadas se inocularon directamente con la bacteria y las raíces pilosas se generaron en sistema

hidropónico. De igual manera, se obtuvieron plantas compuestas portadoras de los vectores control *35S:GFP-GUS* o *pTdt-DC-SAC*. Para verificar la eficiencia de sobreexpresión y silenciamiento de las respectivas construcciones, mediante qPCR, se cuantificaron los niveles de transcritos en las raíces con pérdida o ganancia de la función del gen *PvFlap-II $\alpha$*  y en las raíces que expresan el vector control correspondiente.

### **5) Análisis del fenotipo de raíces sobreexpresantes o silenciadas en la expresión de *PvFlap-II $\alpha$***

Con el objetivo de conocer la función de *PvFlap-II $\alpha$*  en la nodulación, se inocularon las raíces de plantas compuestas con *R. tropici* (CIAT 899) ( $DO \geq 0.05$ ). Al cabo de los 21 y 28 dpi se cuantificó el número de nódulos por planta y se midió la tasa de fijación de nitrógeno. Este ensayo se realizó mediante el método descrito por (Hardy *et al.*, 1968 y Burris, 1972) y los valores de la reducción de acetileno se normalizaron con el peso seco de los nódulos.

### **6) Análisis estadístico**

Los niveles de transcritos del gen *PvFlap-II $\alpha$*  en raíces portadoras de la construcción *35S:PvFlap-II $\alpha$ -GFP* y de la construcción control, se analizaron estadísticamente mediante una prueba *Wilcoxon* (Bauer, 1972). Igual procedimiento se aplicó para analizar la acumulación de transcritos en raíces silenciadas y su respectivo control. Los valores de la acumulación de transcritos de *PvFlap-II $\alpha$*  y *II $\beta$*  en raíces de 3, 5 y 7 dpi y no inoculadas, se analizaron con la prueba *t-student* (Zimmerman, 1997). Por su parte, para comparar los niveles de transcritos en raíces de 14 y 21 dpi y no inoculadas, se utilizó la prueba *Kruska-Wallis* (Hollander y Wolfe, 1973). La acumulación de transcritos de *PvFlap-II $\gamma$*  en raíces inoculadas y no inoculadas, en todos los estadios de la nodulación analizados, se analizó con las pruebas *Kruska-Wallis* y *post hoc Dunn* (Dunn, 1964).

Los valores de la cuantificación de nódulos en raíces a los 28 dpi silenciadas en la expresión de *PvFlap-II $\alpha$* , así como los de la tasa de fijación de nitrógeno en raíces sobreexpresantes de 21 y 28 dpi fueron analizados mediante la prueba *t-student*. Por otra parte, los valores del número de nódulos de raíces con ganancia en la función de *PvFlap-II $\alpha$*  a los 21 y 28 dpi y con pérdida de la función de este gen a los 21 dpi, se analizaron con la prueba *Wilcoxon*. Esta misma prueba estadística se aplicó para la comparación de la tasa de fijación de nitrógeno en raíces silenciadas en la expresión de *PvFlap-II $\alpha$*  a los 21 y 28 dpi. Finalmente, los niveles de

transcritos en raíces silenciadas y con sobreexpresión, inoculadas con *R. tropici* a los 21 y 28 dpi, se analizaron mediante las pruebas *Wilcoxon* y *t-student*, respectivamente. Todas las pruebas estadísticas se realizaron en la paquetería *R V. 3.4.3* (<https://www.r-project.org/>) y la normalidad de los datos se comprobó mediante *Shapiro–Wilk test* (Patrick Royston, 1982). Las pruebas *Wilcoxon* y *Kruskal–Wallis*, se aplicaron en los casos en lo que los datos no cumplieron con la distribución normal.

## IV) Resultados

### 1) Análisis *in silico* de los genes *PvFlap*

Como resultado del análisis *in silico* realizado en el genoma de frijol (v2.1 *Phytozome 12.1.4*), se encontraron 21 genes que codifican FLAp (*PvFLAp*). Las secuencias de aminoácidos de las 21 *PvFLAp* presentan varios motivos conservados característicos de las FLAp (Fig. 1), así como un dominio patatina típico de estas enzimas. Particularmente, en las proteínas codificadas por los genes Phvul.007G248300.1 y Phvul.001G126800.1, respectivamente, se identificó un dominio de función no conocida (DUF, del inglés: *domain of unknown function*). Además, no presenta varios de los motivos conservados de las FLAp, por ejemplo, carecen de la secuencia de unión a aniones DGGGXRG y de los motivos conservados DGGXXANN y SLGTG. Además, en el lugar del motivo SAAPtYF está la secuencia CAFPLGF y el motivo esterasa GTSTG está sustituido por GSSVG (Fig. 1).

En 6 de las 21 *PvFLAp*, el motivo GTSTG presenta una glicina (G) en el lugar de la serina (S). Como lo indica el resultado del análisis filogenético, que se describe a continuación, cuatro de estas seis proteínas, pertenecen al grupo II de las FLAp. Otra variación de los motivos conservados de las FLAp se encontró en la *PvFLAp* codificada por el gen Phvul.003G077100.1 que no presenta el motivo SLGTG (Fig. 1). Esta proteína, además contiene tres dominios ricos en repeticiones de leucina (LRR, del inglés: *leucine rich repeats*) y tres dominios armadillo (Tabla 3 y Fig. S1A). En plantas, los dominios LRR están conservados en proteínas relacionadas con la inmunidad innata (Ng y Xavier, 2011). Por su parte, los dominios armadillo están presentes en muchas proteínas con funciones en la señalización intracelular (Coates, 2003) y no se han descrito en otras FLAp por otros autores. Otro resultado novedoso fue la predicción, mediante la herramienta bioinformática *SignalP 5.0*, de la presencia de un péptido señal de secreción en cinco *PvFLAp* (Tabla 3).

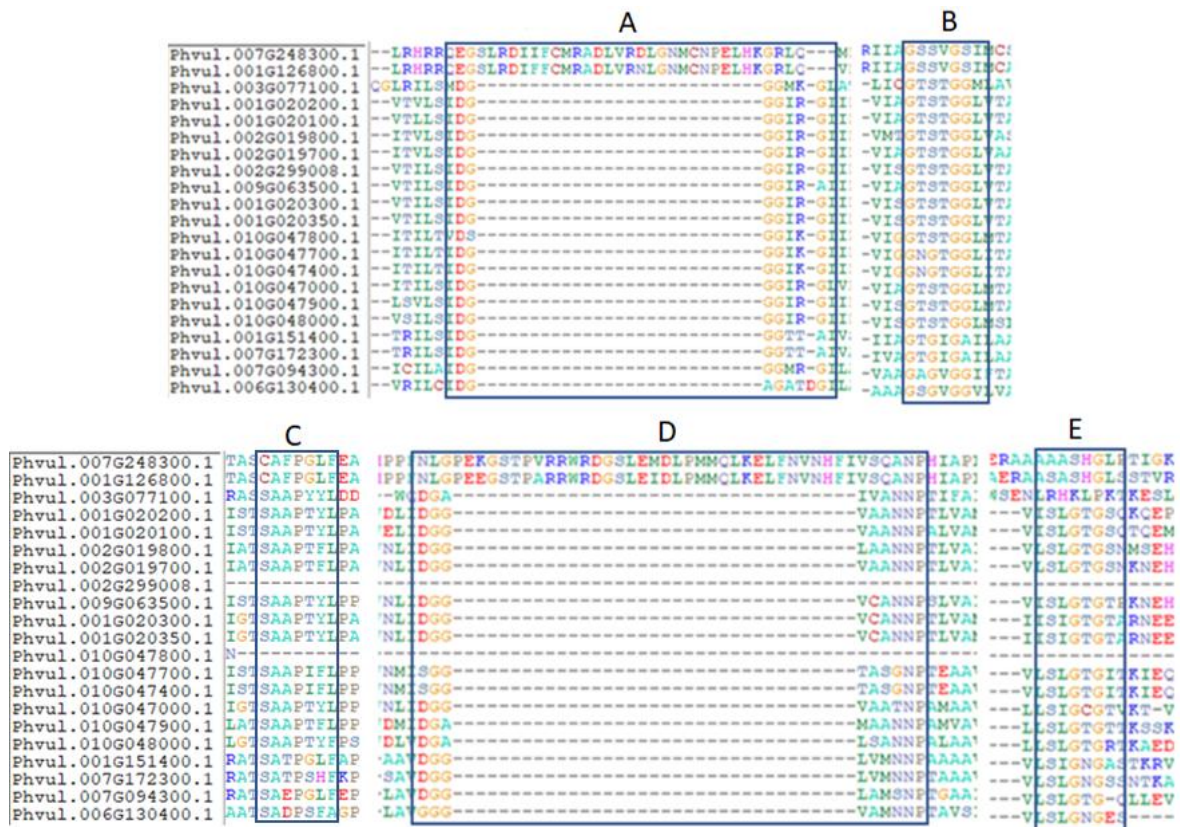


Figura 1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las *PvFLAP*. En recuadros se muestran varias secuencias conservadas no canónicas típicas de las FLAP. (A): secuencia de unión a aniones DGGGx(xx), (B): motivo esterasa GTSTG, (C): motivo conservado SAAPTylF, (D): motivo catalítico DGGXXANN y (E): motivo conservado SLGTG.

Acorde a las relaciones filogenéticas con las FLAP de *A. thaliana* y de *O. sativa*, las *PvFLAP* se pueden agrupar en cuatro clados. Solo 1 de las 21 *PvFLAP* (Phvul.003G077100.1) está relacionada filogenéticamente con las de grupo I. Otras 14 forman un clado con las FLAP de grupo II, 4 se agrupan con las de grupo III y 2 con las de grupo IV, el cual no está presente en *A. thaliana*, pero sí en *O. sativa* donde también se describió un grupo V (Fig. 2). Los genes Phvul.001G020200.1, Phvul.001G020100.1 y Phvul.001G020300.1, *PvFlap-IIα*, *IIBβ* y *Ily*, respectivamente, están incluidos en el clado II (Fig. 2).

Tabla 3. Posición de los diferentes dominios y del péptido señal putativo presentes en la secuencia polipeptídica de las 21 FLAp identificadas en el genoma de *P. vulgaris*.

Anotación <i>Phytozome 12.1.4</i>	Dominios. Posición (aa)	Anotación <i>Phytozome 12.1.4</i>	Dominios. Posición de (aa)	Péptido señal. Posición (aa)
Phvul.001G020100.1	Patatina (24-231)	Phvul.001G151400.1	Patatina 31-234	No
Phvul.001G020200.1	Patatina (13-233)	Phvul.007G172300.1	Patatina 31-233	No
Phvul.009G063500.1	Patatina (23-229)	Phvul.002G299008.1	Patatina 17-97	No
Phvul.001G020300.1	Patatina (23-230)	Phvul.010G047800.1	Patatina 5-156	No
Phvul.002G019800.1	Patatina (20-229)	Phvul.010G047000.1	Patatina 35-230	1-21
Phvul.002G019700.1	Patatina (21-230)	Phvul.010G048000.1	Patatina 35-229	1-18
Phvul.001G020350.1	Patatina (20-230)	Phvul.010G047700.1	Patatina 38-229	1-23
Phvul.007G094300.1	Patatina (77-286)	Phvul.010G047400.1	Patatina 38-116	1-23
Phvul.006G130400.1	Patatina (66-260)	Phvul.010G047900.1	Patatina 35-229	1-22
Phvul.003G077100.1	Patatina (547-789)	Phvul.001G126800.1	DUF3336 (92-226)	No
	LRR (206-252)		Patatina (233-435)	
	3 Armadillo (366-407; 410-448; 450-490)	Phvul.007G248300.1	DUF3336 (91-226)	No
	Patatina (547-789)		Patatina (233-435)	

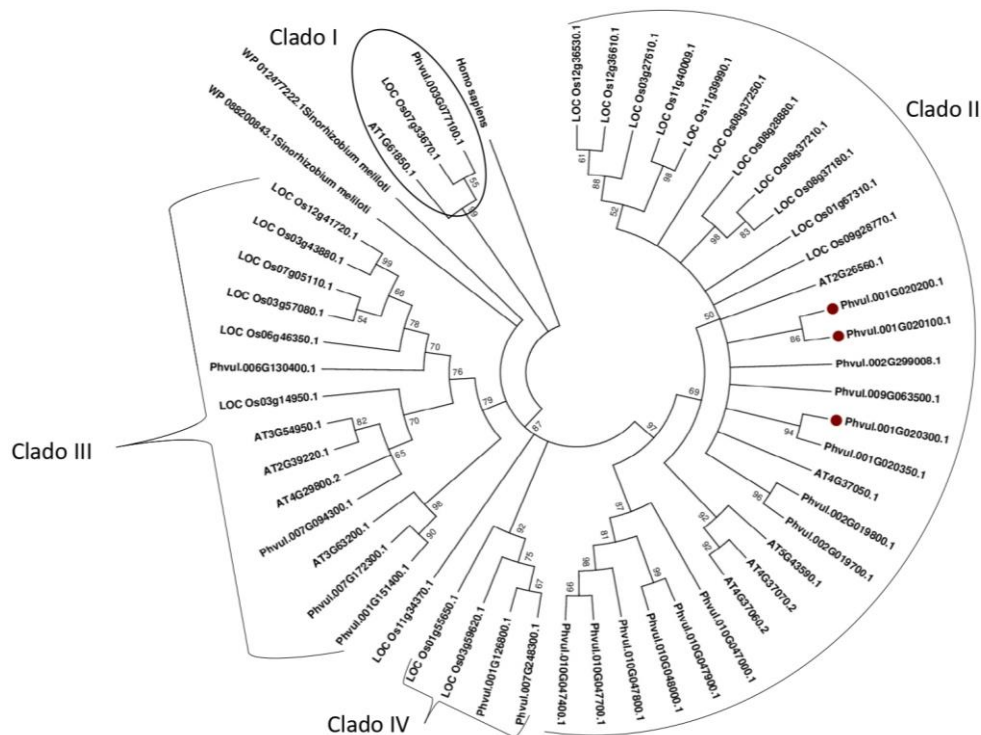


Figura 2. Árbol filogenético construido con secuencias de aminoácidos de FLAp de *P. vulgaris* (Phvul), *A. thaliana* (AT), *O. sativa* (LOC Os) y *S. meliloti* (WP\_012477222.1 y WP\_088200843.1). Como raíz se usó la secuencia de la FLA<sub>2</sub> independiente de Ca<sup>2+</sup> (XP\_011514576.1) de *Homo sapiens*. El árbol se construyó con el software *Mega 7.0* mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo LG. El porcentaje de *Bootstrap* obtenidos a partir de 1 000 iteraciones se muestra en los nodos. En café se señalan los tres genes bajo estudio.

Para conocer los niveles de expresión de los genes *PvFlap-IIα*, *IIβ* y *IIγ* se hizo uso del recurso bioinformático *PvGEA*. La visualización de los niveles de expresión de los genes *PvFlap-IIα* y *IIβ* en el atlas de expresión génica de *P. vulgaris*, mostró que el gen *PvFlap-IIα* se expresa mayoritariamente en raíces. Los mayores niveles de expresión de este gen corresponden a raíces de 21 días carentes de nódulos inefectivos y en raíces completas colectadas de plantas en estado de segundo trifolio. Por su parte, el gen *PvFlap-IIβ* presenta un máximo de expresión en entrenudos y hojas de plantas en estadio de segundo trifolio, así como en raíces completas colectadas de plantas en estado de segundo trifolio y nódulos de cinco días (Fig. 3). Para el gen *PvFlap-IIγ* no se encontró perfil de expresión.

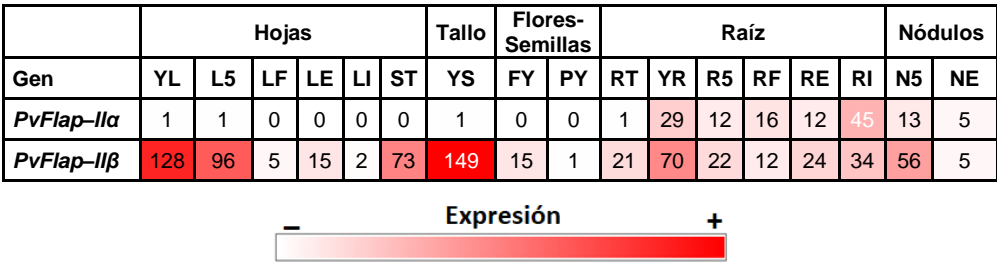


Figura 3. Mapa de expresión de los genes *PvFlap-IIα* y *PvFlap-IIβ* en plantas de frijol común *PvGEA* (O'Rourke *et al.*, 2014). YL: hojas segundo trifolio, L5: hojas de cinco días posterior la fertilización con rizobios, LF: hojas de plantas fertilizadas colectadas al mismo tiempo, LE: hojas de plantas inoculadas con rizobium de 21 dpi, LI: hojas colectadas 21 días luego de fertilizadas con rizobios inefectiva, YS: entrenudos de plantas en estado de segundo trifolio, ST: brotes de plantas en segundo trifolio, FY: flores colectadas antes de emerger, PY: vainas jóvenes (1-4 días luego de senescencia floral), RT: ápice de raíz de plantas en estado de segundo trifolio, YR: raíz completa de plantas en segundo trifolio, R5: raíz completa separada primordios de nódulos de cinco días, RF: raíz completa con nódulos de 21 días, RE: raíz completa desnodulada a los 21 días, RI: raíz completa separada de nódulos inefectivos a los 21 días, N5: primordios de nódulos de 5 días y NE: nódulos efectivos de 21 días

**2) Cuantificación de transcritos de los genes *PvFlap-IIα*, *PvFlap-IIβ* y *PvFlap-IIγ* durante la nodulación**

No se encontraron diferencias estadísticas en la acumulación de transcrito de *PvFlap-IIα* respecto al control en los primeros 7 dpi (Fig. 4A). Por su parte, los niveles de transcritos del *PvFlap-IIβ* solo mostraron diferencias significativas a los 3 dpi respecto al control ( $P= 0.0365$ ) (Fig. 4B).

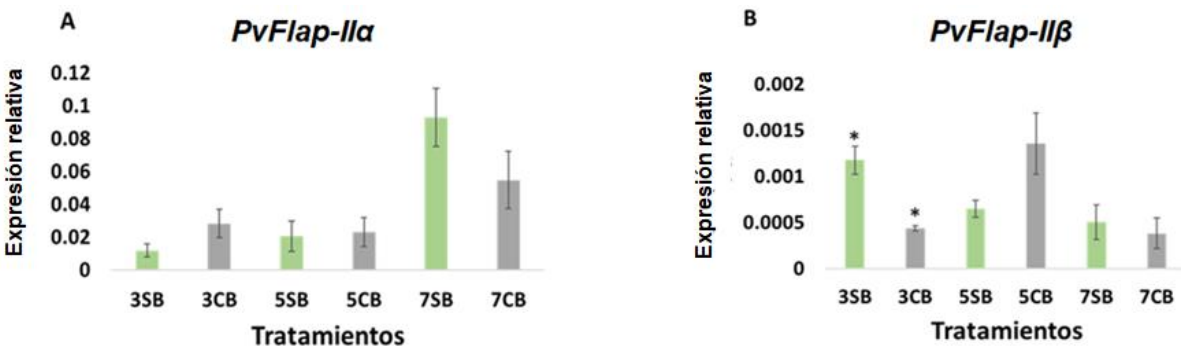


Figura 4. Expresión relativa de *PvFlap-II $\alpha$*  (A) y *PvFlap-II $\beta$*  (B) en raíces silvestres de frijol a los 3, 5 y 7 días sin inocular (SB: sin bacteria) e inoculadas con *R. tropici* (CB: con bacteria). La acumulación de transcritos se normalizó con los niveles de expresión de *EF1 $\alpha$* . Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas técnicas procedentes de tres réplicas biológicas (n= 15). Los asteriscos indican diferencias significativas vs control (*t*-test. \* $P \leq 0.05$ ).

Los niveles de transcritos del gen *PvFlap-II $\alpha$*  en raíces completas (con nódulos), raíces no inoculadas y raíces desnoduladas de 14 dpi mostraron diferencias significativas respecto a la acumulación de transcritos en nódulos de 14 y 21 dpi (Fig. 5A). También se observó que la expresión de este gen disminuyó en raíces sin inocular, raíces completas y raíces desnoduladas de 21 dpi en comparación con las de 14 dpi (Fig. 5A). Por otra parte, la acumulación de transcritos del gen *Pvflap-II $\beta$*  también mostró cambios significativos entre tratamientos a los 14 y 21 dpi. Los niveles de transcritos en raíces desnoduladas de 14 dpi fue estadísticamente diferente a los de raíces sin inocular a los 21 días, a los de nódulos de 14 dpi y a los de raíces desnoduladas de 21 dpi. También hubo diferencias estadísticas entre los niveles de transcritos de nódulos de 14 dpi y de raíces completas de 21 dpi (Fig. 5B).

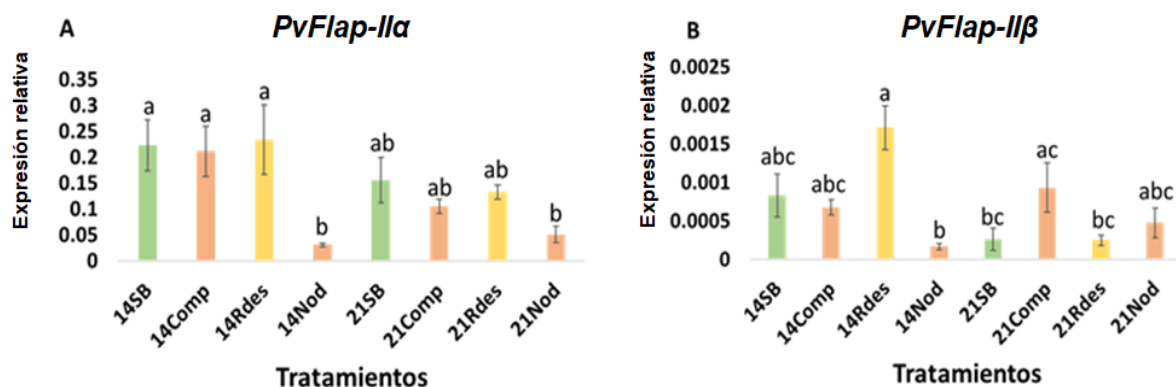


Figura 5. Expresión relativa de *PvFlap-II $\alpha$*  (A) y *Pvflap-II $\beta$*  (B) en raíces silvestres de frijol a los 14 y 21 días sin inocular (SB: sin bacteria) e inoculadas con *R. tropici* (Comp: raíces completas incluidos los nódulos, Rdes: raíces desnoduladas, Nod: solo nódulos). La acumulación de transcritos se normalizó con los niveles de expresión de *EF1 $\alpha$* . Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas técnicas procedentes de al menos dos réplicas biológicas (n= 10–15). Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos (*Kruskal-Wallis test*.  $P = 0.02043$  (A);  $P = 0.05057$  (B); *Dunn test*.  $P \leq 0.05$ ).

Los niveles de transcritos de *PvFlap-II $\gamma$*  fueron poco detectables en raíces de tres y cinco días tanto inoculadas como no inoculadas y no hubo diferencias significativas vs control. La acumulación de transcritos en raíces desnoduladas 14 y 21 dpi fue estadísticamente diferente a la de raíces no inoculadas de 14 y 21 días y a la de nódulos de 14 dpi. Por su parte, los niveles de transcritos en raíces completas de 14



y 21 dpi y de nódulos de 21 dpi no mostraron diferencias entre sí y fueron similares a los niveles de expresión en el resto de las muestras (Fig. 6, A y B).

De manera general, la acumulación de transcritos de los tres genes en nódulos de 14 y 21 dpi fue más baja que en el resto de los tratamientos. En raíces completas (con nódulos), con la excepción del gen *PvFlap-IIβ* a los 21 dpi, los niveles de expresión fueron más bajos que en las raíces desnoduladas, aunque no estadísticamente diferentes. El gen *PvFlap-IIα*, se seleccionó para analizar su función, durante la nodulación, en raíces con ganancia o disminución de su expresión. Por otra parte, se obtuvieron las construcciones para el silenciamiento y la sobreexpresión de *PvFlap-IIγ* con el objetivo de estudiar su función en la nodulación en futuros trabajos.

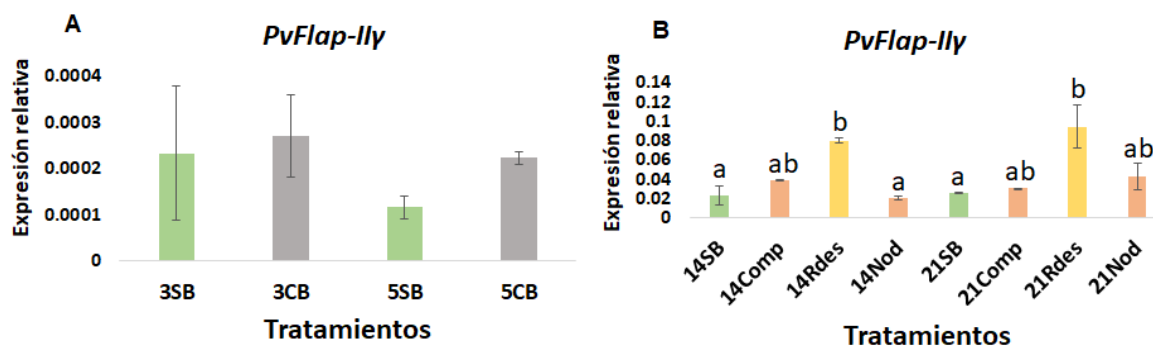


Figura 6. Expresión relativa de *PvFlap-IIγ* en raíces silvestres de frijol. A: 3 y 5 días sin inocular (SB: sin bacteria) e inoculas con *R. tropici* (CB: con bacteria). B: 14 y 21 días sin inocular (SB: sin bacteria) y 14 y 21 dpi (Comp: raíces completas incluidos los nódulos, Rdes: raíces desnoduladas, Nod: solo nódulos). La acumulación de transcritos se normalizó con los niveles de expresión de *EF1α*. Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas técnicas procedentes de al menos dos réplicas biológicas (n= 10–15). Las letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos (*Kruskal–Wallis test*, *Dunn test post hoc*,  $P \leq 0.05$ ).

### 3) Construcciones para la sobreexpresión y el silenciamiento

Mediante el sistema de clonación *Gateway* y con el uso del vector de clonación *pENTR/D–TOPO* y el de expresión *pH7FWG2D*, se obtuvieron las construcciones para sobreexpresar los genes *PvFlap-IIα* (*35S:PvFlap-IIα–GFP*) y *PvFlap-IIγ* (*35S:PvFlap-IIγ–GFP*). En el vector *pH7FWG2D* la expresión del transgén queda regulada por el promotor constitutivo de origen viral *CamV35S* (Fig. 7 A y B). Las construcciones para el silenciamiento de *PvFlap-IIα* (*pTdT–DC–PvFlap-IIα–RNAi*) y de *PvFlap-IIγ–RNAi* (*pTdT–DC–PvFlap-IIγ–RNAi*) (Fig. 8 A y B), se generaron mediante la misma tecnología con el uso del vector de clonación *pENTR/D–TOPO* y

el de expresión *pTdT-DC-RNAi*. En este vector, la expresión de los ARNi está regulada por el promotor CamV35S.

La acumulación de transcritos del gen *PvFlap-IIα* en las raíces portadoras de la construcción para la sobreexpresión, fue significativamente diferente vs control ( $P=0,002525$ ) (Fig. 10 A). Por otra parte, los niveles de transcritos de dicho gen en raíces portadoras de la construcción para el silenciamiento, también fue estadísticamente diferente respecto al control ( $P=0,007937$ ). Este resultado permitió corroborar que la construcción para la sobreexpresión o para el silenciamiento son capaces de incrementar o abatir, respectivamente, la expresión del gen *PvFlap-IIα*.

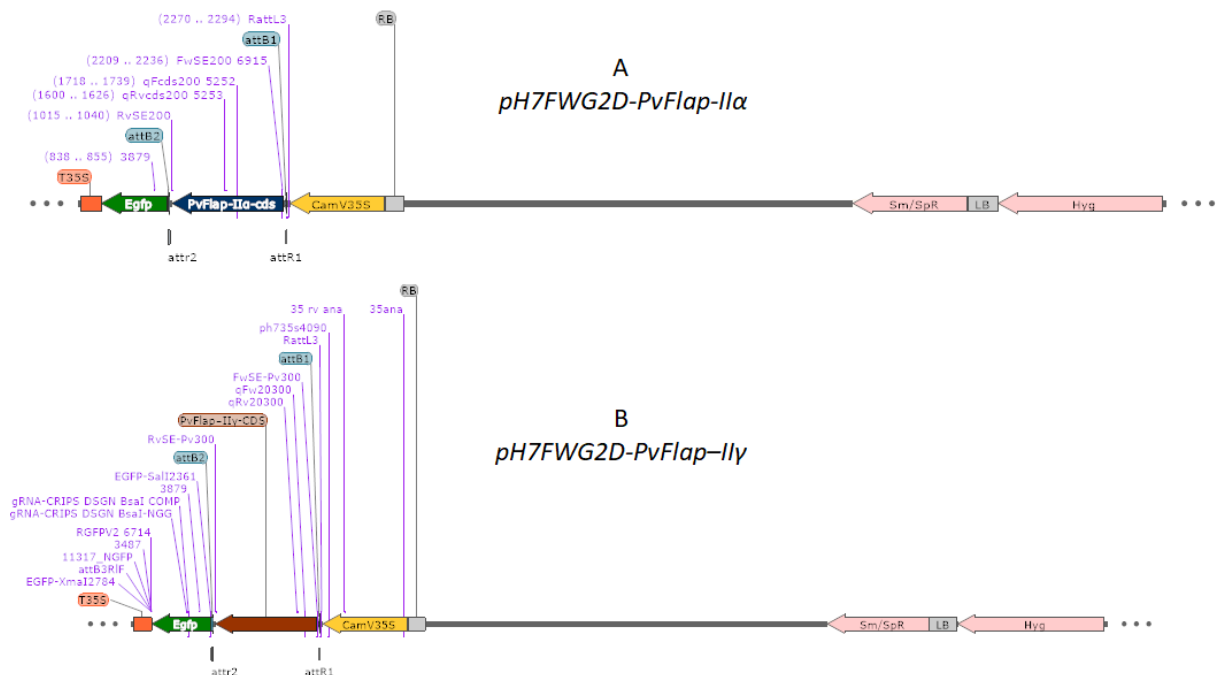


Figura 7. Esquema lineal del vector binario *pH7FWG2D*, que porta la construcción para la sobreexpresión de los genes *PvFlap-IIα* (A) y *PvFlap-IIγ* (B). Ambas construcciones contienen la secuencia codificadora de *PvFlap-IIα* o *PvFlap-IIγ* (azul y café, respectivamente) fusionada al gen de la proteína verde fluorescente (GFP). La expresión del respectivo gen fusionado a la GFP está regulada por el promotor CamV35S. Además, cuenta con un gen de resistencia a espectinomicina y estriptomicina (Sm/SpR) como marcador de selección.

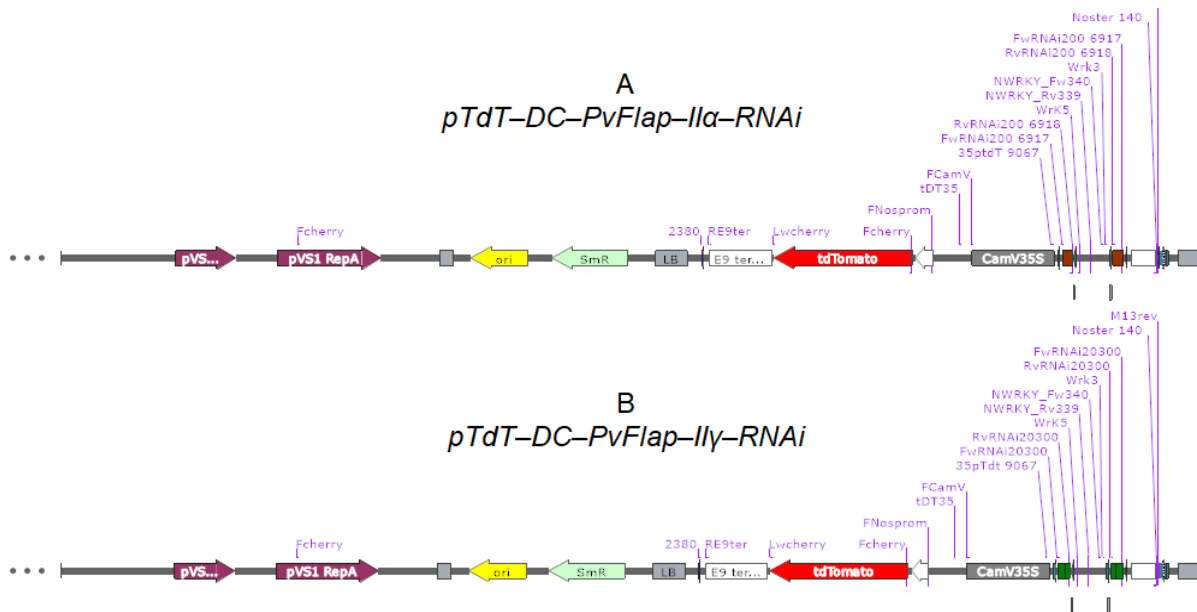


Figura 8. Esquema lineal del vector binario *pTdT-DC-RNAi* portador de la construcción para el silenciamiento de los genes *PvFlap-IIα* (A) y *PvFlap-IIγ* (B). Ambas construcciones contienen dos copias de un fragmento de cada gen (café y verde, *PvFlap-IIα* y *PvFlap-IIγ* respectivamente) para generar los ARNi. La expresión de los ARNi está regulada por el promotor CamV35S. Además, cuentan con un gen de resistencia a espectinomicina y estriptomicina (SmR) como marcador de selección el gen que codifica la proteína roja fluorescente (tdTomato).

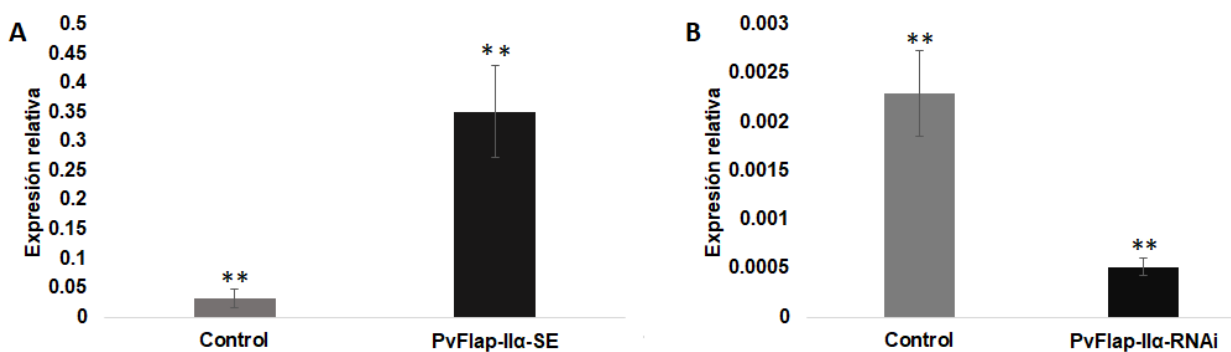


Figura 9. Expresión relativa de transcritos de *PvFlap-IIα*. (A) raíces sobreexpresantes vs control (35S:GFP-GUS). (B) raíces silenciadas vs control (*pTdT-DC-SAC*). La acumulación de transcritos se normalizó con los niveles de expresión del gen *EF1α*. Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas técnicas procedentes de tres réplicas biológicas ( $n=5-7$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas vs control. *Wilcoxon test*. (\*\* $P \leq 0,01$ ).

#### 4) Análisis del fenotipo de raíces con pérdida o ganancia de la expresión de *PvFlap-IIα*

La cuantificación del número de nódulos de raíces inoculadas con *R. tropici*, con ganancia o pérdida de la función de *PvFlap-IIα* a los 21 y 28 dpi, no mostró diferencias estadísticas respecto a las raíces control (transformadas con las construcciones 35S:GFP-GUS y *pTdT-DC-SAC*, respectivamente) (Fig. 10 y 11). Sin embargo, sí hubo diferencias significativas entre la tasa de fijación de nitrógeno de nódulos de raíces con ganancia de la función de *PvFlap-IIα* en relación con el

control ( $P= 0,00483$  y  $P= 0.015$ ; 21 y 28 dpi, respectivamente) (Fig. 12). En nódulos de raíces con disminución de la expresión de *PvFlap-II $\alpha$* , la tasa de fijación de nitrógeno también fue estadísticamente diferente vs control ( $P= 3.815e-06$   $P= 0,007495$ ; 21 y 28 dpi, respectivamente) (Fig. 13). Los nódulos de raíces control siempre mostraron menor tasa de fijación de nitrógeno. Por otra parte, la expresión de *PvFlap-II $\alpha$*  en raíces transformadas con la construcción para el silenciamiento, no fue estadísticamente diferente respecto al control, a los 21 y 28 dpi (Fig. 14).

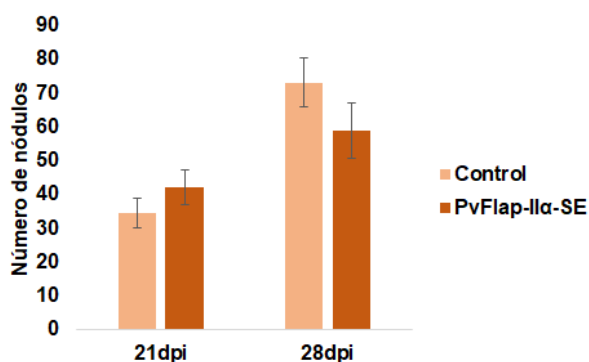


Figura 10. Número de nódulos de raíces de 21 y 28 dpi inoculadas con *R. tropici*. *PvFlap-II $\alpha$ -SE*: raíces transformadas con el vector para la sobreexpresión de *PvFlap-II $\alpha$* . Control: raíces que expresan el vector control (35S:*GFP-GUS*). Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas biológicas (n= 25–32). *Wilcoxon test*.

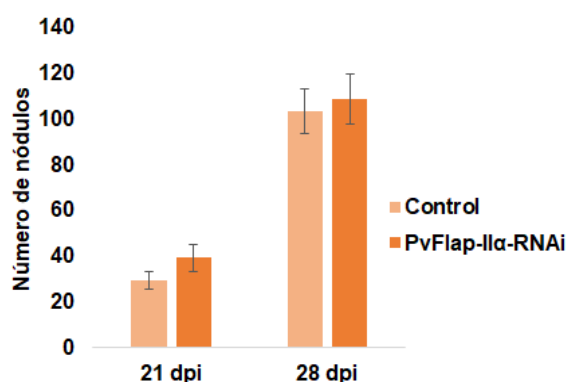


Figura 11. Número de nódulos de raíces de 21 y 28 dpi inoculadas con *R. tropici*. *PvFlap-II $\alpha$ -RNAi*: raíces transformadas con el vector para el silenciamiento de *PvFlap-II $\alpha$* . Control: raíces que expresan el vector control (*pTdT-DC-SAC*). Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas biológicas (n= 28–35). *Wilcoxon test*. (21 dpi), *t-student test*. (28 dpi).

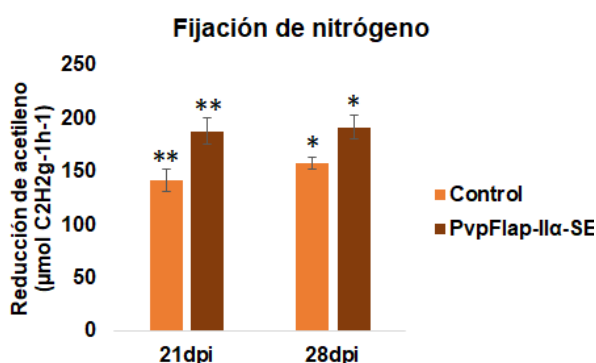


Figura 12. Tasa de fijación de nitrógeno de nódulos de raíces de 21 y 28 dpi inoculadas con *R. tropici*. *PvFlap-II $\alpha$ -SE*: raíces transformadas con el vector para la sobreexpresión de *PvFlap-II $\alpha$* . Control: raíces que expresan el vector control (35S:*GFP-GUS*). Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas técnicas (n= 13–20). Los asteriscos indican

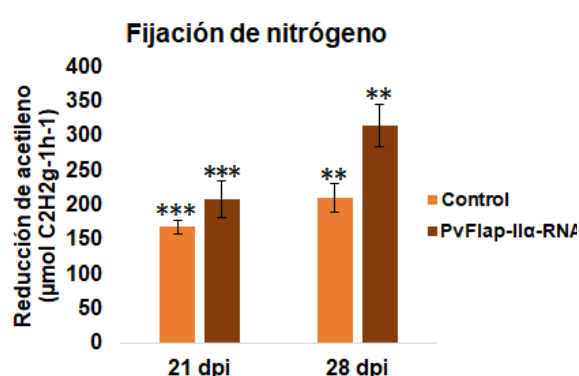


Figura 13. Tasa de fijación de nitrógeno de nódulos de raíces de 21 dpi y 28 dpi inoculadas con *R. tropici*. *PvFlap-II $\alpha$ -RNAi*: raíces transformadas con el vector para el silenciamiento de *PvFlap-II $\alpha$* . Control: raíces que expresan el vector control (*pTdT-DC-SAC*). Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas

diferencias estadísticas vs control. *t-student test*. (\* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ).

biológicas (. Los asteriscos indican diferencias estadísticas vs control. *Wilcoxon test*. (\*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$ ).

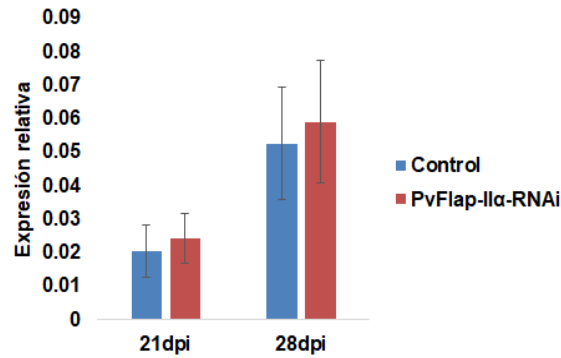


Figura 14. Expresión relativa de transcritos de *PvFlap-IIα* a los 21 y 28 dpi inoculadas con *R. tropici*. *PvFlap-IIα-RNAi*: raíces con disminución de la expresión de *PvFlap-IIα*. Control: raíces que expresan el vector control (*pTdT-DC-SAC*). La acumulación de transcritos se normalizó con los niveles de expresión del gen *EF1α*. Las barras de error muestran la media  $\pm$  ESM de tres réplicas técnicas de al menos dos réplicas biológicas ( $n = 4-6$ ) (. *Wilcoxon test* (21 dpi), *t-student test* (28 dpi).

## V) Discusión

Las fosfolipasas FLAp se caracterizan por presentar motivos conservados y un dominio tipo patatina que contiene la secuencia consenso de unión a aniones DGGGXRG y el motivo conservado dentro del centro catalítico DGGXXANN (revisado por Scherer *et al.*, 2010). Dos de las 21 PvFLAp carecen de ambos elementos conservados y el motivo esterasa GTSTG muy conservado en las FLAp, está sustituido por GSSVG. La ausencia de estos elementos conservados y la presencia del motivo GSSVG, también se observaron en las dos FLAp de grupo IV de arroz (OsFLAp-IV), (Fig. S2), donde también están descritas 21 FLAp (Liu *et al.*, 2015). Interesantemente, estas dos PvFLAp se agruparon en el mismo clado de las OsFLAp-IV, lo que sugiere que el grupo IV de las FLAp está representado por una minoría de estas enzimas con motivos muy conservados. Sin embargo, ninguna de las 10 FLAp descritas en Arabidopsis se agruparon en este clado según el presente análisis filogenético y lo documentado por Holk *et al.* (2002).

Teniendo en cuenta los caracteres específicos observados en la estructura primaria de las dos PvFLAp y OsFLAp de grupo IV, es de esperar que estas proteínas tengan actividades enzimáticas diferentes a las demás FLAp. En este sentido, se podría hipotetizar que las FLAp de grupo IV presentan características estructurales y funcionales distintivas entre las FLAp. Sin embargo, en base a las herramientas bioinformáticas y métodos experimentales utilizados en este trabajo, no fue posible determinar si tales cambios podrían afectar la función de estas dos enzimas. Por tanto, se considera importante realizar estudios que aporten más conocimientos acerca de la estructura y función de dichas enzimas. Además, también sería importante explorar más a fondo con un enfoque filogenético que permita dilucidar la presencia de FLAp del grupo IV en otras especies de plantas.

En este trabajo se encontró que las FLAp de grupo III (FLAp-III) de frijol presentan una modificación en el motivo esterasa GTSTG, la cual también se observó en las FLAp-III de Arabidopsis (Fig. S3) y está descrita en las FLAp-III de arroz (Liu *et al.*, 2015). A partir de estos resultados, se podría plantear que dicha modificación del motivo esterasa es una característica típica de las FLAp-III. Mediante *análisis in silico*, se identificó una sola FLAp de grupo I (FLAp-I) en frijol, lo que concuerda con descrito en otras dos especies de plantas en las que solo se ha identificado un miembro de este grupo (Holk *et al.*, 2002 y Liu *et al.*, 2015). Estos resultados indican que las FLAp-I son las menos representadas en plantas. Conforme con lo

observado en el árbol filogenético, las FLAp-I están más emparentadas con las FLA<sub>2</sub> independientes de Ca<sup>2+</sup> de humano, que con el resto de las FLAp. Al respecto, se ha planteado que, debido a su alta identidad con las FLA<sub>2</sub> independientes de Ca<sup>2+</sup>, las FLAp-I son el grupo evolutivamente antiguo más (revisado por Scherer *et al.* (2010).

La presencia de tres dominios LRR y armadillos presentes en la FLAp-I de frijol, parecen ser características conservadas en las FLAp-I, ya que, el primero también se observó en la FLAp-I de arroz y de Arabidopsis (Fig. S1 B y C) donde está reportado (revisado por Scherer *et al.*, 2010). En cuanto a los dominios armadillo, aunque no han sido descritos en las FLAp-I de otras especies, en el presente trabajo sí se identificaron la FLAp-I de Arabidopsis y la de arroz (Fig. S1B).

Mediante el análisis filogenético, se pudo determinar que 14 de las 21 *PvFLAp* pertenecen a las FLAp de grupo II, curiosamente 13 de estas proteínas están codificadas por genes que presentan cinco o seis intrones. Por otra parte, tres de los cuatro genes que codifican las *PvFLAp-III* solo tienen un intrón y el gen que codifica la única *PvFLAp-I* presenta 17 intrones. Estos resultados concuerdan estrechamente con lo descrito en relación con el número de intrones de la familia de genes que codifican las FLAp de Arabidopsis (Holk *et al.*, 2002). Sin embargo, la presencia de un péptido señal en 5 de las 21 *PvFLAp*, contrasta con lo descrito por Holk *et al.*, (2002), ya que, estos autores no reportan la presencia de algún péptido señal en ninguna de las 10 FLAp de Arabidopsis. Teniendo en cuenta el tipo de péptido señal que presentan estas cinco *PvFLAp* y el tipo de sustrato que hidrolizan, es de esperar que estas proteínas se encuentren asociadas a membranas.

En general, las FLAp constituyen una subfamilia de fosfolipasas de plantas codificadas por familias multigénicas y que pueden ser clasificadas en cinco grupos acorde con sus relaciones filogenéticas. De estos grupos, el más representado en frijol es el II, al igual que en Arabidopsis y arroz y los menos representados son el I y V, este último solo presente en arroz. Desde el punto de vista filogenético, las FLAp-I son filogenéticamente más cercanas a las FLA<sub>2</sub> independientes de Ca<sup>2+</sup> de animales que a las demás FLAp de plantas. Como característica común, todas las FLAp contienen un dominio patatina y varios motivos conservados con algunas modificaciones en sus secuencias, fundamentalmente entre los miembros de cada grupo.

Los resultados obtenidos en este trabajo, mediante qPCR evidenciaron que el gen *PvFlap-IIa* tiene mayor expresión en raíces silvestres de frijol inoculadas con *R.*

*tropici* que el gen *PvFlap-IIβ*. Estos resultados corroboran el perfil de expresión presente en el atlas de expresión génica de frijol (*PvGEA*) (O'Rourke *et al.*, 2014). Debido a que no se encontró el perfil de expresión de *PvFlap-IIγ* en *PvGEA* no fue posible compararlo con los datos obtenidos. Las diferencias estadísticas de la acumulación de transcritos de *PvFlap-IIβ* a los 3 dpi vs control podrían deberse a un efecto provocado por el proceso de infección de la bacteria. Sin embargo, este efecto no se mantuvo a los 5 y 7 dpi, además los niveles de expresión fueron relativamente bajos en estos períodos. No obstante, no se descarta la posibilidad de que la expresión de *PvFlap-IIβ* se afecte en estadios muy tempranos de la infección por rizobios.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la acumulación de transcritos de *PvFlap-IIα* y *PvFlap-IIγ* durante los primeros 7 dpi. Esto podría deberse a que estos genes no tienen un efecto regulador de la nodulación en etapas tempranas. Particularmente, la acumulación de transcritos de *PvFlap-IIγ* a los 7 dpi fue extremadamente variable entre las tres réplicas (datos no mostrados).

De especial interés es el hecho de que la acumulación de transcritos en nódulos de 14 y 21 dpi fue muy baja en los tres genes estudiados. Particularmente, la expresión de *PvFlap-IIγ* no fue significativamente diferente en nódulos y raíces completas vs raíces no inoculadas. Sin embargo, sí hubo diferencias estadísticas entre raíces desnoduladas vs raíces no inoculadas tanto a los 14 dpi como a los 21 dpi. Estos resultados pueden deberse a que la baja acumulación de transcritos de *PvFlap-IIγ* en nódulos, podría haber enmascarado las diferencias de su expresión en raíces completas vs no inoculadas.

Aunque no hubo diferencias significativas en la cantidad de nódulos de las raíces transformadas con la construcciones *35S:PvFlap-IIα-GFP* o *pTdT-DC-PvFlap-IIα-RNAi* vs control, sí se encontraron diferencias estadísticas en la tasa de fijación de nitrógeno. Resultó inesperado que, la tasa de fijación de nitrógeno fue mayor tanto en nódulos de raíces transformadas con la construcción para la sobreexpresión como para el silenciamiento en comparación con el correspondiente control. Este fenotipo puede estar relacionado con que, en raíces de 21 y 28 dpi, no se observó un nivel de silenciamiento significativo de la construcción *pTdT-DC-PvFlap-IIα-RNAi*. Sin embargo, este defecto de la construcción para el silenciamiento no sería la causa de la aparición del mismo fenotipo en las raíces transformadas con la construcción para la sobreexpresión. De acuerdo con lo anterior, se considera que



ambas construcciones pudieron provocar un desbalance en la expresión génica de la raíz capaz de inducir el fenotipo observado.

Por otra parte, es posible que alguno de los miembros de esta familia multigénica, que codifica las *PvFLAp*, haya tenido un efecto regulador sobre la expresión de *PvFlap-II $\alpha$* . Este posible efecto ha sido propuesto por otros autores debido a la ausencia de fenotipo en plantas de *Arabidopsis* con pérdida de uno de los genes que codifica *AtFLAp* (Rietz *et al.*, 2010). Además, es importante señalar que, en un análisis más detallado del transcriptoma de frijol realizado en el grupo de trabajo, se observó que el gen *PvFlap-II $\alpha$*  no presenta la expresión diferencial detectada en estudios previos.

Según lo reportado en la literatura, el gen *PvFlap-II $\alpha$*  codifica para una enzima hidrolítica de fosfolípidos y galactolípidos, los cuales son componentes esenciales de membrana de cloroplastos. A la fecha, no se conoce ningún trabajo que demuestre que la degradación de componentes de membranas tenga algún efecto directo en la organogénesis nodular. Reportes en la literatura indican que los ácidos grasos liberados por la acción de las FLAp son importantes mediadores en los mecanismos de defensa ante patógenos (Dhondt *et al.*, 2000 y La Camera *et al.*, 2005). Además, se ha visto que la lisofosfatidilcolina, un derivado de la hidrólisis de fosfolípidos por FLAp, es capaz de inducir transportadores de fosfatos en la simbiosis micorrízica arbuscular en *M. truncatula* (Drissner *et al.*, 2007).

Otro aspecto para señalar en este trabajo, es la escasa nodulación a los 14 dpi en raíces transgénicas portadoras de las construcciones para el silenciamiento, para la sobreexpresión o las construcciones control. Este fenotipo contrasta con el de raíces silvestres que a los 14 dpi presentan abundantes nódulos maduros. Este retraso en la nodulación está descrito por Estrada-Navarrete *et al.* (2007), quienes plantean que la maduración de los nódulos en raíces transgénicas demora entre tres y cuatro semanas. En este sentido, podría pensarse que las raíces transgénicas pueden ser afectadas por factores ambientales como temperatura y humedad, que de alguna manera perturban la regulación de la nodulación.

Previamente, se realizó un análisis transcriptómico comparativo de raíces silenciadas o no en la expresión del gen *PvRBohB*, durante la simbiosis con el hongo micorrízico arbuscular *Rizophagus irregularis* o con la bacteria *R. tropici*. En este análisis, se encontró que, en raíces con un fondo genético de silenciamiento del gen referido, la expresión del gen *PvFlap-II $\gamma$*  está disminuida en raíces micorrizadas

en relación con las no micorrizadas (Fonseca–García *et al.*, 2019, sometido a publicación).

Por el contrario, en raíces micorrizadas sin fondo genético de silenciamiento del gen *PvRBohB*, existe un aumento en la expresión del gen *PvFlap–Ily* respecto a raíces no micorrizadas. Por otra parte, se encontró que en las raíces con disminución de la expresión de *PvRBohB* inoculadas con *R. tropici*, el nivel de acumulación del transcrito *PvFlap–Ily* está aumentado con respecto a las raíces no inoculadas. Dado el interés de conocer el efecto que podría tener este gen en la simbiosis micorrízica arbuscular con frijol, se considera importante analizar el fenotipo de raíces con pérdida o ganancia de la función de *PvFlap–Ily* en la simbiosis con *R. irregularis*. Atendiendo a este interés, en este trabajo se obtuvieron las construcciones para el silenciamiento y la sobreexpresión de dicho gen.

## VI) Conclusiones

- ✓ Las *PvFLAp* están codificadas por una familia multigénica de 21 miembros y presentan varios motivos conservados entre las *FLAp* descritos en otras especies de plantas, así como y un dominio patatina típico de estas proteínas.
- ✓ Las *PvFLAp* se pueden clasificar en cuatro grupos filogenéticamente relacionados y los miembros de cada grupo presentan varias características comunes en la estructura primaria.
- ✓ Los niveles de transcritos de los genes *PvFlap-II $\alpha$* , *II $\beta$*  y *II $\gamma$* , en las etapas iniciales de la nodulación estudiadas, no se afectan por la presencia de los rizobios. Mientras que, a los 14 y 21 dpi, la baja acumulación de transcritos en los nódulos pudo haber enmascarado algún efecto significativo producido por la bacteria, especialmente sobre la expresión de *PvFlap-II $\gamma$* .
- ✓ Es posible que otro miembro de la familia de *PvFlap* haya compensado la función de *PvFlap-II $\alpha$*  en raíces con pérdida de la función de este gen.
- ✓ Las construcciones para el silenciamiento y para la sobreexpresión de *PvFlap-II $\alpha$*  podrían haber provocado un desbalance en la expresión génica de la raíz que indujo un fenotipo no relacionado con la función del gen en la nodulación.

## VII) Perspectivas

- ✓ Cuantificar los niveles de transcritos de *PvFlap-II $\alpha$*  en raíces transformadas con la construcción para la sobreexpresión de dicho gen, inoculadas con *R. tropici* a los 21 y 28 dpi.
- ✓ Observar la localización tisular de *PvFlap-II $\alpha$*  en raíces transgénicas, mediante el análisis de la actividad del promotor de este gen.
- ✓ Analizar el fenotipo de raíces transgénicas con pérdida o ganancia de la función del gen *PvFlap-II $\gamma$* , en la simbiosis con *R. tropici* y con *R. irregularis*.

## VIII) Literatura citada

- Arthikala, M. K., Montiel J., Nava, N., Santana, O., Sánchez-López, R., Cárdenas, L. y Quinto, C. (2013): *PvRbohB* negatively regulates *Rhizophagus irregularis* colonization in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 54 (8): 1391–1402.
- Arthikala, M. K., Sánchez-López, R., Nava, N., Santana, O., Cárdenas, L. y Quinto, C. (2014): *RbohB*, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytologist.* 202: 886–900.
- Bauer D. F. (1972): Constructing confidence sets using rank statistics. *Journal of the American Statistical Association.* 67: 687–690.
- Bourcy M., Brocard L., Pislariu, C. I., Cosson, V., Mergaert, P., Tadege M., Mysore, K. S., Udvardi, M. K., Gourion, B. y Ratet, P. (2013): *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions. *New Phytologist.* 197: 1250–1261.
- Burris, R. H. (1972): Nitrogen Fixation: Assay techniques. *Methods in Enzymology.* 24: 415–431.
- Broughton W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. y Vanderleyden, J. (2003): Beans (*Phaseolus spp.*)—model food legumes. *Plant and Soil.* 252: 55–128.
- Canonne, J., Froidure-Nicolas S. y Rivas, S. (2011): Phospholipases in action during plant defense signaling. *Plant Signaling & Behavior.* 6 (1): 13–18.
- Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F. y Quinto, C. (2008): Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *The Plant Journal.* 56: 802–813.
- Charron, D., Pingret, J. L., Chabaud, M., Journet, E. P. y Barker, D. G. (2004): Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium* nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca<sup>2+</sup> spiking and specific *ENOD* gene expression. *Plant Physiology.* 136: 3582–3593.
- Chomczynski, P. y Sachi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 162(1): 156–159.
- Coates, J. C. (2003): Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends Cell Biol.* 13 (9):463–471.
- Cooper, J. E. (2007): Early interactions between legumes and rhizobia: Disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology.* 103: 1355–1365.
- D'Ambrosio J. M., Couto, D., Fabro, G., Scuffi, D., Lamattina, L., Munnik, T., Andersson, M. X., Alvarez, M. E., Zipfel, C. y Laxalt, A. M. (2017): PLC2 Regulates MAMP-triggered immunity by modulating ROS production in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 175: 970–981.

- den Hartog, M., Musgrave, A. y Munnik, T. (2001): Nod factor–induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *The Plant Journal*. 25 (1): 55–65.
- den Hartog, M., Verhoef, N. y Munnik, T. (2003): Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension–cultured alfalfa Cells. *Plant Physiology*. 132: 311–317.
- Dhondt, S., Geoffroy, P., Stelmach, B. A., Legrand M. y Heitz, T. (2000): Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus–infected tobacco leaves and is contributed by patatin–like enzymes. *The Plant Journal*. 23 (4): 431–440.
- Drissner D., Kunze, G., Callewaert, N., Gehrig, P., Tamasloukht, M. B., Boller, T., Felix, G., Amrhein, N. y Bucher, M. (2007): Lyso–phosphatidylcholine is a signalin in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science*. 318 (5848): 265–268.
- Dunn, O. J. (1964): Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*. 6: 241–252.
- Estrada–Navarrete, G., Alvarado–Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillén, G., Díaz–Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P. M. y Sanchez, F. (2007): Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus spp.* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*. 2: 1819–1824.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., Davies, J. M., y Dolan, L. (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422: 442–446.
- Genre, A. y Russo, G. (2016): Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant–microbe interactions? *Frontiers in Plant Science*. 7: 1–8.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N. y Rokhsar, D. S. (2012): Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Reseach*. 40 (D1): D1178–D1186.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Dräxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T. L. y Parniske, M. (2010). NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell*. 22: 2509–2526.
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K. y Burns, R. C. (1968): The acetylene–ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 43: 1185–1207.
- Hollander M. y Wolfe, D. A. (1973): Nonparametric Statistical Methods. (pp. 115–120). New York: John Wiley & Sons.
- Holk, A., Rietz, S., Zahn, M., Quader, H. y Scherer, F. E. G. (2002): Molecular identification of cytosolic, patatin–related phospholipases A from Arabidopsis with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiology*. 130: 90–101.

- Kanamori, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E. M., Miwa, H., Downie, J. A., James, E. K., Felle, H. H., Haaning, L.L., Jensen, T. H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. y Stougaard J. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 359–364.
- Karimi, M., Inzé, D. y Depicker, A. (2002): GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Science*.7 (5): 19–35.
- La Camera, S., Geoffroy, P., Samaha, H., Ndiaye, A., Rahim, G., Legrand, M. y Heitz, T. (2005): A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 44: 810–825.
- Lee, H. Y., Bahn, S. C., Shin, J. S., Hwang I., Back, K., Doelling, J. H. y Ryu, S. B. (2005): Multiple forms of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in plants. *Progress in Lipid Research*. 44 (2005): 52–67.
- Letunic, I. y Bork, P. (2017): 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*. 1–4.
- Li, G. F., Lin, F. y Xue, H. W. (2007): Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of FLDβ1 in seed germination. *Cell Research*. 17: 881–894.
- Li, M. y X. Wang (2014): pPLA: Patatin-Related Phospholipase As with multiple biological functions. En Wang, X. (Ed): Phospholipases in plant signaling (pp. 27–54). New York, U.S.A.: Springer.
- Liu, G., Zhang, K., Ai, J., Deng, X., Hong, Y. y Wang, X. (2015): Patatin-related phospholipase A, pPLAIIIα, modulates the longitudinal growth of vegetative tissues and seeds in rice. *Journal of Experimental Botany*. 66: 6945–6955.
- Martínez-Romero E. (2009): Coevolution in Rhizobium-Legume Symbiosis? *DNA and Cell Biology*. 28: 361–370.
- Matos, A. R., D’Arcy-Lameta, A., França, M., Pêtres, S., Edelman, L., Kader, J-C., Zuily-Fodil, Y. y Pham-Thi, A. T. (2002): A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Letters*. 491: 188–192.
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Sánchez-López, R., Arthikala, M. K., Santana, O., Sánchez, F. y Quinto, C. (2012): A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for infection by rhizobia. *Plant Cell Physiol*. 53: 1751–1767.
- Munnik, T. (2014): PI-PLC: Phosphoinositide-phospholipase C in plant signaling. En Wang, X. (Ed): Phospholipases in plant signaling (pp. 27–54). New York, U.S.A.: Springer.
- Muñoz-Azcarate O., González A. M. y Santalla, M. (2017): Natural rhizobial diversity helps to reveal genes and QTLs associated with biological nitrogen fixation in common bean. *AIMS Microbiology*. 3: 435–466.

- Ng, A. y Xavier, R. J. (2011): Leucine-rich repeat (LRR) proteins Integrators of pattern recognition and signaling in immunity. *Autophagy*. 7 (9): 1082–1084.
- Nielsen, H. (2017): Predicting secretory proteins with SignalP. En Kihara, D. (Ed): Protein function prediction. *Methods in Molecular Biology* (pp. 59–73). New York, U.S.A.: Humana Press.
- Ohashi, Y., Oka, A., Rodrigues-Pousada, R., Possenti, M., Ruberti, I., Morelli, G. y Aoyama, T. (2003): Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science*. 300 (5624): 1427–1430.
- Oldroydd, G. E. D. y Downie, J. A. (2008): Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*. 59:519–546.
- Oldroydd, G. E. D. (2013): Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 252–263.
- O'Rourke, J. A., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., Jackson, S. A., McClean, P. E., Li, J., Dai, X., Zhao, P. X., Hernandez, G. y Vance, C. P. (2014): An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics*. 15 (866): 1–16.
- Peleg-Grossman, S., Volpin, H. y Levine, A. (2007): Root hair curling and Rhizobium infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *Journal of Experimental Botany*. 58 (7):1637–1649.
- Pingret, J. L., Journet, E. P. y Barker, D. G. (1998): Rhizobium Nod factor signaling: evidence for a G protein-mediated mechanism. *Plant Cell*. 10: 659–671.
- Rietz, S., Dermendjiev, G., Oppermann, E., Tafesse, F. G., Effendi, Y., Holk, A., Parker, J. E., Teige, M. y Scherer, G. F. E. (2010): Roles of Arabidopsis patatin-related phospholipases a in root development are related to auxin responses and phosphate deficiency. *Molecular Plant*. 3: 524–538.
- Royston P. (1982): An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples. *Applied Statistics*. 31: 115–124.
- Rubio, M. C., James, E. K., Clemente, M. R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C. P. y Becana, M. (2005): Localization of Superoxide Dismutases and Hydrogen Peroxide in Legume Root Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17 (12): 294–1305.
- Ryu, S. B. (2004): Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. *Trends in Plant Science*. 9 (5): 229–235.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J. A., Parniske, M., Hayashi, M. y Kawaguchi, M. (2007). NUCLEOPORIN 85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell*. 19: 610–624.

- Santos, R.; Hérouart, D., Sigaud, S., Touati D. y Puppo, A. (2001): Oxidative Burst in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* Symbiotic Interaction. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 14 (1): 86–89.
- Scherer, G. F. E., Ryu, S. B., Wang, X., Matos, A. R. y Heitz, T. (2010): Patatin-related phospholipase A: Nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends in Plant Science*. 15 (12): 693–700.
- Singh, A., Baranwal, V., Shankar, A., Kanwar, P., Ranjan, R., Yadav, S., Pandey, A., Kapoor, S. y Pandey, G. K. (2012): Rice phospholipase A superfamily: organization, phylogenetic and expression analysis during abiotic stresses and development. *PLoS ONE*. 7 (2): 30947– 30947.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A. y Mittler, R. (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 14: 691– 699.
- Torres, M. A. y Dangl, J. L. (2005): Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 397–403.
- Valdez-López, O., Arenas-Huertero, C., Ramírez, M., Girard, L., Sánchez, F., Vance, C. P., Reyes, J. L. y Hernández, G. (2008): Essential rol of MYB transcription factor: PvHPR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signaling in common bean root. *Plant Cell & Enviroment*. 3. 1 (12): 1834–1843.
- Vincent, J. M. (1970): A Manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Hambooch No. 15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 164p.
- Wan, J., Torres, M., Ganapathy, A., Thelen J., DaGue, B. B., Mooney, B., Xu, D. y Stacey, G. (2005): Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18 (5): 458–467.
- Wang, D., Yang, S., Tang F. y Zhu, H. (2012) Symbiosis specificity in the legume–rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*. 14: 334–342.
- Wang, X. (2001): Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 211–31.
- Wang, X. (2005): Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiology*. 139: 566–573.
- Zhang, Q., van Wijk, R., Zarza, X., Shahbaz, M., van Hooren, M., Guardia, A., Scuffi, D., García-Mata, C., Van den Ende, W., Hoffmann-Benning, S., Haring, M. A., Laxalt A. M. yMunnik, T. (2018): Knock–down of Arabidopsis PLC5 reduces primary root growth and secondary root formation while overexpression improves drought tolerance and causes stunted root hair growth. *Plant and Cell Physiology*. 59 (10): 1–16.
- Zimmerman, D. W. (1997). A Note on Interpretation of the Paired–Samples t Test. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*. 22 (3): 349–360.

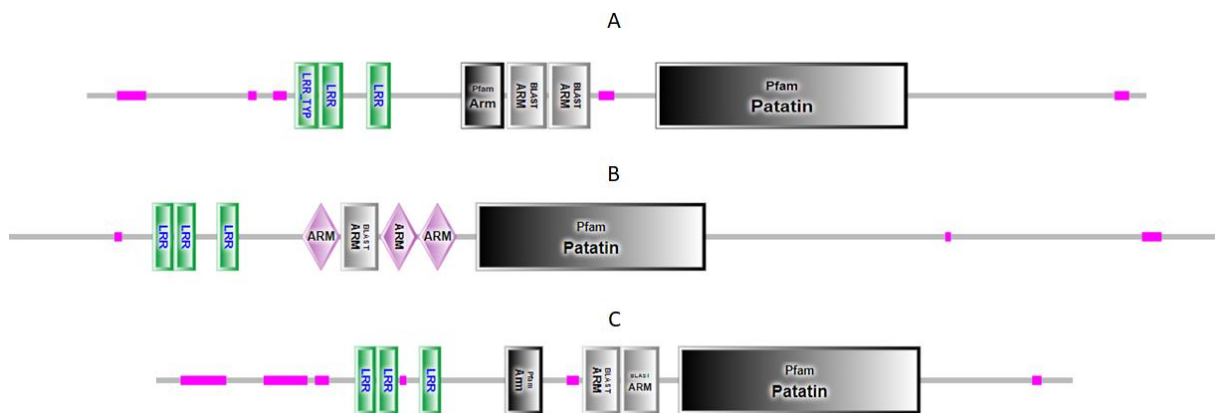


## IX) Material suplementario

**Table S1.** Soluciones para preparar medio Fahraeus (Vicent, 1970).

Solución	Reactivo	Concentración (μM)
1	CaCl <sub>2</sub>	680
2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	734
3	Fe-Citrato	18.5
4	MgSO <sub>4</sub>	468
5	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1042
Trazas Gibson	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 pone 1 ml de cada solución por cada litro de volumen final



**Figura S1.** Representación esquemática de los dominios conservados en las FLAP-I de *P. vulgaris* (A), *A. thalina* (B) y *O. sativa* (C). De izquierda a derecha se muestran los dominios LRR, armadillo (Arm) y patatina.

	A		B		C
LOC Os01g55650.1	LHKGR--LC	LOC Os01g55650.1	GSSVGSII	LOC Os01g55650.1	NHFIVSCANF
LOC Os03g59620.1	LHKGR--IE	LOC Os03g59620.1	GSSVGSII	LOC Os03g59620.1	NHFIVSCANF
LOC Os11g34370.1	ARFRG--FRRF	LOC Os11g34370.1	GEVFLGLI	LOC Os11g34370.1	DN---CRSNGT
LOC Os07g33670.1	MDGGG--MKGL	LOC Os07g33670.1	GTSTGGMI	LOC Os07g33670.1	DGAI-VANNPT
LOC Os01g67310.1	IDGGG--VKGI	LOC Os01g67310.1	GTSTGGI	LOC Os01g67310.1	DGGM-AANNPT
LOC Os08g37250.1	-----	LOC Os08g37250.1	-----	LOC Os08g37250.1	DGGV-AANNPT
LOC Os11g40009.1	IDGGG--IRGI	LOC Os11g40009.1	GTSTGAL	LOC Os11g40009.1	DRGV-AANNPT
LOC Os11g39990.1	IDGGG--IRGI	LOC Os11g39990.1	GTSTGAL	LOC Os11g39990.1	DGGV-AANNPT
LOC Os03g27610.1	IDGGG--IRGI	LOC Os03g27610.1	GTSTGGI	LOC Os03g27610.1	DGGV-AANNPT
LOC Os12g36530.1	IDGGG--IRGI	LOC Os12g36530.1	GTSTGGI	LOC Os12g36530.1	DGGV-AANNPT
LOC Os12g36610.1	APGEG-----	LOC Os12g36610.1	-----	LOC Os12g36610.1	DGGV-AANNPT
LOC Os09g28770.1	IDGGG--IRGI	LOC Os09g28770.1	GTSTGGI	LOC Os09g28770.1	DGGV-AANNPT
LOC Os08g28880.1	IDGGG--VRGI	LOC Os08g28880.1	GTSTGGI	LOC Os08g28880.1	DGGV-AANNPT
LOC Os08g37210.1	IDGGG--VRGI	LOC Os08g37210.1	GTSTGGI	LOC Os08g37210.1	DGGV-AANNPT
LOC Os08g37180.1	IDGGG--VRGI	LOC Os08g37180.1	GTSTGGI	LOC Os08g37180.1	DGGV-AANNPT
LOC Os03g14950.1	VDGGGGGLRAL	LOC Os03g14950.1	GTGAGGVI	LOC Os03g14950.1	DGGP-IMGSPA
LOC Os06g46350.1	IDGGA--DGGG	LOC Os06g46350.1	GSGAGGFI	LOC Os06g46350.1	TGGGGAVSNPA
LOC Os03g43880.1	IDGCG--SSGA	LOC Os03g43880.1	GAGAGGVI	LOC Os03g43880.1	SGGVAAMSNPA
LOC Os12g41720.1	IDGCG--PGP	LOC Os12g41720.1	GAGAGGVI	LOC Os12g41720.1	SGGVAAMGNPT
LOC Os03g57080.1	IDGGRAADGI	LOC Os03g57080.1	GSGAGGVI	LOC Os03g57080.1	SGGL-ALGNPT
LOC Os07g05110.1	VDGGARPEDGI	LOC Os07g05110.1	GSGAGGVI	LOC Os07g05110.1	SGGV-ALGNPT
Clustal Consensus		Clustal Consensus		Clustal Consensus	

**Figura S2.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las OsFLAP. En cuadros se muestran las sustituciones de varias de las secuencias conservadas de las FLAP presentes en las OsFLAP-IV. (A): sustitución de la secuencia de unión a aniones DGGGx(xx) por LHKGRLx, (B): sustitución del motivo esterasa GTSTG, por GSSVG, (C): sustitución del motivo conservado DGGXXANN por NHFIVSQAN.

AT1G61850.1	C	G	T	S	T	G	G	M
AT2G26560.1	A	G	T	S	T	G	G	L
AT4G37050.1	S	G	T	S	T	G	G	L
AT5G43590.1	A	G	T	S	T	G	G	L
AT4G37070.2	A	G	T	S	T	G	G	L
AT4G37060.2	A	G	T	S	T	G	G	L
AT3G63200.1	A	G	T	G	I	G	G	I
AT4G29800.2	A	G	S	G	V	G	G	V
AT2G39220.1	S	G	S	G	I	G	G	I
AT3G54950.1	A	G	S	G	I	G	G	I
Clustal Cons.	.	*	:	.	*	:	*	*

**Figura S3.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las *AtFLAp*. En el cuadro se señala la sustitución de la serina (S) por glicina (G) en el motivo esterasa GTSTG, en las cuatro *AtFLAp*–III.

### Protocolo S1

#### Protocolo de extracción de ARN en un solo paso (modificado de Chomczynsky y Sacchi, 1987).

- 1-Macerar tejido en presencia de nitrógeno líquido.
- 2-Agregar 1 ml de TRIzol.
- 3-Mezclar por vortex 15 s e incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 4-Adicionar 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclar por vortex e incubar 3 min a TA.
- 5-Centrifugar a 11 800 rpm a 4°C durante 15 min.
- 6-Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, adicionar isopropanol (1:1 v/v) en incubar 10 min a TA
- 7-Centrifugar a 11 800 rpm a 4°C durante 10 min.
- 8-Desechar sobrenadante, agregar 500 µl de LiCl (4 M) y agitar con vortex (no resuspender pellet).
- 9-Centrifugar a 5 900 rpm a 4°C durante 20 min.
- 10-Desechar sobrenadante y resuspender e pellet en 500 µl de TE (pH= 8).
- 11-Adicionar 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) y mezclar por vortex.
- 12-Centrifugar a 5 900 rpm a 4°C durante 10 min.
- 13-Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, adicionar isopropanol (1:1 v/v) y 66 µl de acetato de sodio (3 M, pH= 5.2)
- 14-Mezclar por vortex y centrifugar a 11 800 rpm a 4°C durante 10 min.
- 15-Desechar sobrenadante, secar pellet y resuspender en 50 µl de agua con DEPC.