



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización funcional de mutantes *ric* y *rip* en el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *Lotus japonicus* y *Mesorhizobium loti*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. Liz Xochiquetzal Hernández Cerezo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega
Programa de Genómica Funcional de Eucariotes
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Damien Formey
Programa de Genómica Funcional de Eucariotes
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Dr. José Luis Reyes
Departamento Biología Molecular de Plantas
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Cuernavaca, Morelos. Junio, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue desarrollado bajo la tutoría del Dr. Mario Alberto Serrano Ortega, Investigador Titular A del Programa de Genómica Funcional de Eucariotes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. Gracias al apoyo económico de DGAPA-PAPIIT por medio del proyecto IN203720.

Gracias a CONACyT por el apoyo económico que me fue otorgado para el desarrollo de este trabajo por medio de la beca número 957577.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Mario Alberto Serrano Ortega por adoptarme en su grupo de investigación y permitirme continuar con el desarrollo de este proyecto bajo su tutoría hasta el final.

Agradezco el apoyo brindado por la Técnico Ing. Martha C. Torres Basaldúa durante el desarrollo de este proyecto.

A Josen Henry Quintanilla Salgado agradezco el apoyo brindado durante el análisis de fenotipo de raíces de *L. japonicus* mediante microscopía óptica en campo claro.

Agradezco al Dr. Alexandre Tromas por alentarme a cursar el posgrado y permitirme desarrollar este proyecto bajo su tutoría los primeros semestres, así como el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto hasta su conclusión.

Gracias a los miembros del comité tutor, Dr. Damien Formey y Dr. José Luis Reyes por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este proyecto, por mantenerse al pie del cañón y ayudarme a superar los obstáculos presentados.

Agradezco al Biol. Víctor Manuel Bustos Zagal por su apoyo técnico durante las primeras etapas del desarrollo de este proyecto.

Agradezco a los miembros del jurado: Dra. Claudia Martínez, Dra. Rosana Sánchez, Dra. Georgina Hernández, Dra. Esperanza Martínez y Dr. Luis Cárdenas por sus correcciones y comentarios tan acertados que me permitieron mejorar la escritura de la presente tesis.

RESUMEN

La simbiosis fijadora de nitrógeno que existe entre leguminosas y rizobios, es un proceso que permite la obtención de compuestos nitrogenados asimilables a las plantas a través de la fijación de nitrógeno atmosférico que producen los rizobios dentro de los nódulos en las raíces de las leguminosas. Se sabe que el establecimiento de los rizobios dentro de las raíces es un proceso dinámico que requiere del rearrreglo del citoesqueleto.

Se han descrito anteriormente algunos de los efectores de ROP (Rho GTPasas de las plantas por sus siglas en inglés) como RIC (siglas de: ROP Interactive CRIB Motiff Containing Proteins) y RIP (siglas de: ROP interactor Proteins) en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, los cuales interactúan con las ROP y participan en la reorganización del citoesqueleto, durante el crecimiento polar del tubo polínico, así como en la interdigitación de células de pavimento de las hojas. En el genoma de *L. japonicus*, se han identificado 7 potenciales RIP y 5 potenciales RIC. Sin embargo, aún se desconoce si estos efectores tienen un papel durante el establecimiento de la simbiosis.

En este proyecto se realizó la fenotipificación de mutantes *RIC* y *RIP* en un ambiente deficiente en nitrógeno e inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno *M. loti* bajo la hipótesis de que en *L. japonicus* las proteínas efectoras RIC1, RIP3, RIP5 y RIP7 participan en la simbiosis fijadora de nitrógeno con *M. loti*. Se analizaron plantas de varias líneas mutantes de las dos familias génicas a 7 días post-inoculación (DPI) con el objetivo de encontrar diferencias durante las etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis y a 28 DPI para evaluar si existe una afectación una vez que el proceso está completamente establecido inoculando con la cepa bacteriana silvestre. Las tres líneas mutantes de *L. japonicus* con las que se realizó la fenotipificación (*ric1.1*, *rip5.1* y *rip7.3*) fueron capaces de desarrollar una simbiosis con *M. loti*. Sin embargo, *rip5.1* y *ric1.1* presentaron algunas diferencias con respecto a las plantas Gifu (WT) en los tiempos post-inoculación evaluados, sugiriendo que las proteínas a las que estos genes codifican podrían estar participando en el establecimiento de la simbiosis. No obstante, el mecanismo por el que actúan debe determinarse todavía.

ABSTRACT

The nitrogen-fixing symbiosis between legumes and rhizobia is a process that allows obtaining nitrogen compounds assimilated by plants through nitrogen fixation carried out by rhizobia within the nodules of legume roots. The establishment of rhizobia within roots is known to be a dynamic process that requires rearrangement of the cytoskeleton.

Some of the ROP's effectors (Rho-GTPases of plants) such as RIC (ROP Interactive CRIB Motif Containing Proteins) and RIP (ROP interactor Proteins) have been previously described in *Arabidopsis thaliana*. These effectors interact with ROP proteins during cytoskeleton rearrangement, during polar growth of the pollen tube, as well as in leaf pavement cell interdigitation. In the *L. japonicus* genome, 7 potential RIP and 5 potential RIC have been identified. However, it is still unknown whether these effectors play a role during symbiosis establishment.

In this project, *L. japonicus* RIC and RIP mutants were characterized in a nitrogen-deficient environment and inoculated with *M. loti* nitrogen-fixing bacteria under the hypothesis that in *L. japonicus* the effector proteins RIC1, RIP3, RIP5 and RIP7 participate in nitrogen-fixing symbiosis with *M. loti*. Plants of several mutant lines of the two gene families were tested at 7 days post-inoculation (DPI) to find differences during the early stages of symbiosis establishment and at 28 DPI to assess whether there is an effect once the process is fully established by inoculating with the wild-type bacteria strain. All three mutant lines of *L. japonicus* with which the phenotyping was performed (*ric1.1*, *rip5.1* and *rip7.3*) were able to develop symbiosis with *M. loti*. However, *rip5.1* and *ric1.1* presented some differences with respect to Gifu (WT) in the post-inoculation times evaluated, suggesting that the proteins these genes encode could be participating in the establishment of symbiosis. However, the mechanism by which these effectors act has yet to be determined.

INDICE

RESUMEN	V
INDICE	VII
Lista de Ilustraciones.	IX
Lista de Figuras.	X
Lista de Tablas.	XI
Lista de abreviaturas	XII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Simbiosis Rizobios-leguminosa.....	2
Citoesqueleto en células vegetales.....	9
Rho GTPasas: regulación y efectores.....	12
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Material Biológico.....	20
Extracción de ADN genómico.....	20
Genotipificación mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).....	21
Elección de los candidatos <i>ric</i> y <i>rip</i> en <i>L. japonicus</i>	24
Fenotipificación.....	25
RESULTADOS	28
Genotipificación mediante amplificación por PCR.....	28
Elección de los candidatos <i>ric</i> y <i>rip</i> en <i>L. japonicus</i>	31
Caracterización de mutantes <i>ric</i> y <i>rip</i> durante el proceso de simbiosis fijadora de nitrógeno.....	34
DISCUSIÓN	44
Elección de candidatos <i>ric</i> y <i>rip</i>	44
Caracterización de mutantes <i>ric</i> y <i>rip</i> en el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno.....	45
CONCLUSIONES	48

PERSPECTIVAS	49
ANEXOS.....	50
1. Soluciones para tinción LacZ	50
2. Gráficas de barras apiladas del conteo de nódulos en raíces de 28DPI del escrutinio para elección de candidatos.....	51
3. Heatmap de datos de expresión de genes <i>RIC</i>	51
4. Heatmap de datos de expresión de genes <i>RIP</i>	52
5. Gráfico de barras apiladas para el conteo de Hilos de infección en raíces de 7DPI.....	52
6. Gráfico de barras apiladas del conteo de nódulos en raíces de 28DPI.....	53

Lista de Ilustraciones.

Ilustración 1. Genes y procesos involucrados en la señalización temprana durante la nodulación.....	4
Ilustración 2. Infección rizobial.....	5
Ilustración 3. Estados del desarrollo de nódulos determinados e indeterminados en leguminosas.....	7
Ilustración 4. Control hormonal de la fijación simbiótica de nitrógeno.....	8
Ilustración 5. Cambios en la organización de microtúbulos en células vegetales.....	9
Ilustración 6. Organización de filamentos de actina durante el establecimiento de la liberación de rizobios en <i>M. truncatula</i>	11
Ilustración 7. Comparación de la organización de microtúbulos en raíces y nódulos de <i>M. truncatula</i>	12
Ilustración 8. Representación esquemática de activación/desactivación de Rho GTPasas.	13
Ilustración 9. Señalización dependiente de ROP.....	14
Ilustración 10. Dominio de interacción CRIB compartido entre proteínas RIC y GAP de <i>A. thaliana</i>	15
Ilustración 11. Regulación del citoesqueleto a través de la interacción de ROPs con efectores RIC y RIP.....	16
Ilustración 12. Alineamiento de secuencias del extremo C-terminal de proteínas RIP en distintas especies.....	18
Ilustración 13. Esquema de hibridación de oligonucleótidos para identificación de alelos silvestres. (Ilustración de Jesús Daniel Castro).....	21
Ilustración 14. Esquema de hibridación de oligonucleótidos Forward y P2 para la identificación de alelos mutantes. (Ilustración de Jesús Daniel Castro.).....	23

Lista de Figuras.

Figura 1. Clasificación de nódulos de acuerdo con su coloración.	27
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para genotipificación de <i>rip7.3</i>	30
Figura 3. A-C) Longitud de raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> y <i>rip7.3</i> , <i>rip3.2</i> y <i>rip5.1</i> , <i>rip3.1</i> y <i>rip7.2</i> a 28 DPI.	32
Figura 4. A-C) Peso fresco de raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> y <i>rip7.3</i> , <i>rip3.2</i> y <i>rip5.1</i> , <i>rip3.1</i> y <i>rip7.2</i> a 28 DPI.	32
Figura 5. Nódulos/cm raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> y <i>rip7.3</i> , <i>rip3.2</i> y <i>rip5.1</i> , <i>rip3.1</i> y <i>rip7.2</i> a 28 DPI.	33
Figura 6. Longitud de raíz de plantas Gifu, <i>ric 1.1</i> , <i>rip 5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 7 DPI..	35
Figura 7. No. de microcolonias/cm de raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> , <i>rip 5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 7 DPI..	35
Figura 8. Hilos de infección totales/cm de raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> , <i>rip5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 7 DPI.	36
Figura 9. Clasificación de hilos de infección. A) Ejemplo de HI epidermal. B) Ejemplo de HI corticales. C) Ejemplo de Hilos de infección con defecto..	37
Figura 10. Hilos de infección epidermales/cm de raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> , <i>rip5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 7DPI.	37
Figura 11. Hilos de Infección corticales/cm de raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> , <i>rip 5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 7DPI.	38
Figura 12. Hilos de Infección defectuosos/cm de raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> , <i>rip 5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 7DPI.	39
Figura 13. Número de primordios de nódulos/cm de raíz de plantas Gifu, <i>ric 1.1</i> , <i>rip 5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 7 DPI.	39
Figura 14. Longitud de raíz de plantas Gifu, <i>ric 1.1</i> , <i>rip 5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 28 DPI.....	40
Figura 15. Número de nódulos totales de plantas Gifu, <i>ric 1.1</i> , <i>rip 5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 28 DPI.....	41
Figura 16. Gráficas de clasificación de nódulos de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> , <i>rip5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 28 DPI.	42
Figura 17. Número de nódulos totales/cm de raíz de plantas Gifu, <i>ric1.1</i> , <i>rip5.1</i> y <i>rip7.3</i> a 28 DPI.	42
Figura 18. Árbol filogenético de proteínas RIC de <i>L. japonicus</i> y <i>A. thaliana</i>	43
Figura 19. Árbol filogenético de proteínas RIP de <i>L. japonicus</i> y <i>A. thaliana</i>	44

Lista de Tablas.

Tabla 1. Genes <i>RIC</i> en <i>L. japonicus</i>	17
Tabla 2. Genes <i>RIP</i> en <i>L. japonicus</i>	18
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de alelos silvestres.....	22
Tabla 4. Programa de PCR para identificar alelos silvestres.	22
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de alelos mutantes.....	23
Tabla 6. Programa de "Touch Down-PCR" para identificar alelos mutantes.	24
Tabla 7. Líneas de inserción <i>rip</i> y <i>ric</i> en <i>L. japonicus</i>	29
Tabla 8. Resultados de genotipificación de plantas mutantes <i>ric</i> y <i>rip</i>	30
Tabla 9. Resumen de cumplimiento de criterios de selección por los candidatos <i>RIC</i> y <i>RIP</i> . ..	34

Lista de abreviaturas

L. japonicus. *Lotus japonicus.*

M. truncatula. *Medicago truncatula.*

A. thaliana. *Arabidopsis thaliana.*

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

M. loti. *Mesorhizobium loti.*

ICR/RIP. Interactor of Constitutive Active ROP / ROP interactor Proteins.

RIC. ROP Interactive CRIB Motiff Containing Proteins.

AON. Autorregulación de la nodulación.

ROP. Rho-GTPasas de plantas.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es un elemento químico identificado con el símbolo N, en condiciones estándar forma un gas diatómico (N_2) que constituye alrededor del 78% de la atmósfera terrestre de acuerdo con los datos de la NASA "Earth: in Depth" (*Earth: In Depth*, s/f). Además, es un elemento esencial para los organismos vivos, dado que forma parte del ADN, ARN y las proteínas que los conforman.

Sin embargo, ni las plantas, ni los animales somos capaces de tomar el nitrógeno atmosférico para la producción de nucleótidos y aminoácidos; dependemos de microorganismos que poseen el complejo enzimático nitrogenasa que les permite convertir el nitrógeno atmosférico en amoníaco (NH_3), un compuesto que las plantas sí pueden absorber para producir moléculas orgánicas. Estos microorganismos fijadores de nitrógeno son principalmente bacterias y arqueas (por ejemplo: *Methanosarcina barkeri*, *Methanococcus thermolithotrophicus*), algunas permanecen en vida libre y otras pueden formar asociaciones simbióticas con algunas especies de plantas, tal es el caso de la simbiosis entre rizobios (por ejemplo: bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* principalmente) y leguminosas (por ejemplo: *Phaseolus vulgaris*, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Pisum sativum*, entre otras.), así como la simbiosis entre bacterias del género *Frankia* con plantas actinorrhizas.

Esta simbiosis fijadora de nitrógeno (SFN) se lleva a cabo en las raíces de las plantas, quienes proveen de nutrientes y un órgano, formado *de novo* exclusivo para el alojamiento de las bacterias llamado nódulo, a cambio de compuestos nitrogenados obtenidos de la fijación biológica del nitrógeno.

En la agricultura, la disponibilidad de nitrógeno en el suelo es uno de los mayores factores limitantes para el crecimiento de los cultivos, lo que ha llevado a la utilización excesiva de fertilizantes sintéticos ricos en nitrógeno, que además de tener costos elevados, contribuyen al calentamiento global mediante la acumulación de gases de efecto invernadero durante su producción. Además, gran parte de los fertilizantes que se aplican en los cultivos no es aprovechado por las plantas debido a que mediante el proceso de lixiviación el fertilizante se acumula en ríos, lagos y el mar, esta acumulación resulta en el crecimiento excesivo de algas y otros microorganismos que bloquean el paso de la luz solar y la oxigenación del agua, lo que conduce a la muerte por asfixia de peces y otros organismos que habitan en estas regiones (*Eutrofización*, 2018).

Actualmente se están buscando alternativas biotecnológicas para disminuir el uso de fertilizantes químicos, una de ellas es la transferencia de la capacidad de las leguminosas de formar asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno a otros cultivos de gran

importancia en la industria alimenticia, como los cereales (Beatty y Good, 2011; Oldroyd y Dixon, 2014). Para lograrlo, es necesario entender completamente la manera en que este proceso de simbiosis se lleva a cabo y los elementos moleculares necesarios que intervienen.

Se sabe que el establecimiento de las bacterias simbióticas dentro de las células vegetales es un proceso dinámico que requiere del rearrreglo del citoesqueleto. Las Rho-GTPasas (llamadas ROP en plantas por su nombre en inglés Rho-GTPases of plants), son pequeñas proteínas consideradas “interruptores moleculares” que están involucradas en diversos procesos, incluyendo el rearrreglo de filamentos de actina, uno de los principales componentes del citoesqueleto y de la nodulación (Feiguelman et al., 2018).

Se han descrito algunos de los efectores de ROP (proteínas que encienden cascadas de señalización al interactuar con las proteínas ROP activas) como RIC y RIP en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, los cuales interactúan con las ROPs en la reorganización del citoesqueleto, durante el crecimiento polar del tubo polínico, así como en la interdigitación de células de pavimento de las hojas (Feiguelman et al., 2018). En el genoma de *L. japonicus*, se identificaron 7 potenciales RIP y 5 potenciales RIC (Mejía-Martínez, 2019). Sin embargo, aún se desconoce si estos efectores tienen un papel durante el establecimiento de la simbiosis. Por lo tanto, es interesante investigar el rol de estas proteínas durante el proceso de simbiosis mediante la genotipificación y fenotipificación de líneas mutantes de inserción LORE1 de *L. japonicus* para algunos de estos miembros.

ANTECEDENTES

Simbiosis Rizobios-leguminosa.

Actualmente se conoce que el proceso de simbiosis rizobios-leguminosas (SRL), tiene lugar cuando las leguminosas que crecen en un ambiente deficiente en nitrógeno secretan flavonoides a través de las raíces que atraen a los rizobios mediante quimiotaxis. En respuesta, los rizobios producen lipoquitos oligosacáridos (específicos de cada cepa), conocidos como factores Nod (Ilustración 1, número 1). Los factores Nod son reconocidos por receptores de tipo LysM-RLK (LysM Receptor-Like Kinase) presentes en la membrana de las células de epidermis de la raíz. Estos receptores indican especificidad en el reconocimiento de los factores Nod entre la leguminosa y el rizobio compatible (*M. loti* para *L. japonicus* y *S. meliloti* para *M. truncatula*) para desarrollar una SFN. En *L. japonicus* estos receptores son denominados LjNFR1 (siglas en inglés de Nod Factor Receptor 1) y LjNFR5 (siglas en inglés de Nod Factor Receptor 5), sus ortólogos en *M. truncatula* son MtLYK3 (siglas en inglés de LysM Receptor Kinase) y MtNFP (siglas en inglés de Nod Factor Perception). Una vez que se perciben los factores Nod LjNFR5 es capaz de formar complejos heteroméricos con LjSYMRK (siglas en inglés de symbiotic receptor-like kinase), un receptor de tipo LRR-RLK (siglas en inglés de Leucine-rich repeat

receptor-like kinase), en *M. truncatula* se conoce como MtDMI2 (siglas en inglés de Does not Make Infection 2) como se muestra en la ilustración 1, números 2 y 3 (Roy et al., 2020).

La percepción de los factores Nod, desencadena una vía de señalización que comparte múltiples componentes con la vía de señalización de micorriza arbuscular, esta vía es conocida como “vía de señalización común simbiótica” donde *LjSYMRK* fue uno de los primeros genes identificados (Roy et al., 2020). Los componentes de la vía común simbiótica en *L. japonicus* son *LjSYMRK* que interactúa con proteínas SIP (siglas en inglés de SYMRK Interacting Proteins) y con la E3 ubiquitin ligasa *LjSIE3* (por sus siglas en inglés SYMRK Interacting E3 Ubiquitin Ligase); canales de calcio *LjCASTOR* y *LjPOLLUX*, nucleoporinas (*LjNUP85*, *LjNUP133*, *LjNENA*) que conllevan a la despolarización de membranas celulares y oscilaciones en la concentración de calcio en el núcleo de los pelos radicales, conocida como “calcium spiking”. Estos cambios en la concentración de calcio nuclear parecen ser reconocidos por CCaMK (calcium-calmodulin kinase) que fosforila los factores de transcripción que permitirán la expresión de genes relacionados a la simbiosis. En el caso de la SFN en *L. japonicus* los factores de transcripción fosforilados por CCaMK son *LjCYCLOPS*, *NSP2* y *NSP1*, que dirigen la expresión de genes relacionados con la infección rizobial y el desarrollo de nódulos (*NIN*, *NF-Y*) como se observa en la ilustración 1, números 3 a 7 (Genre y Russo, 2016; Roy et al., 2019)

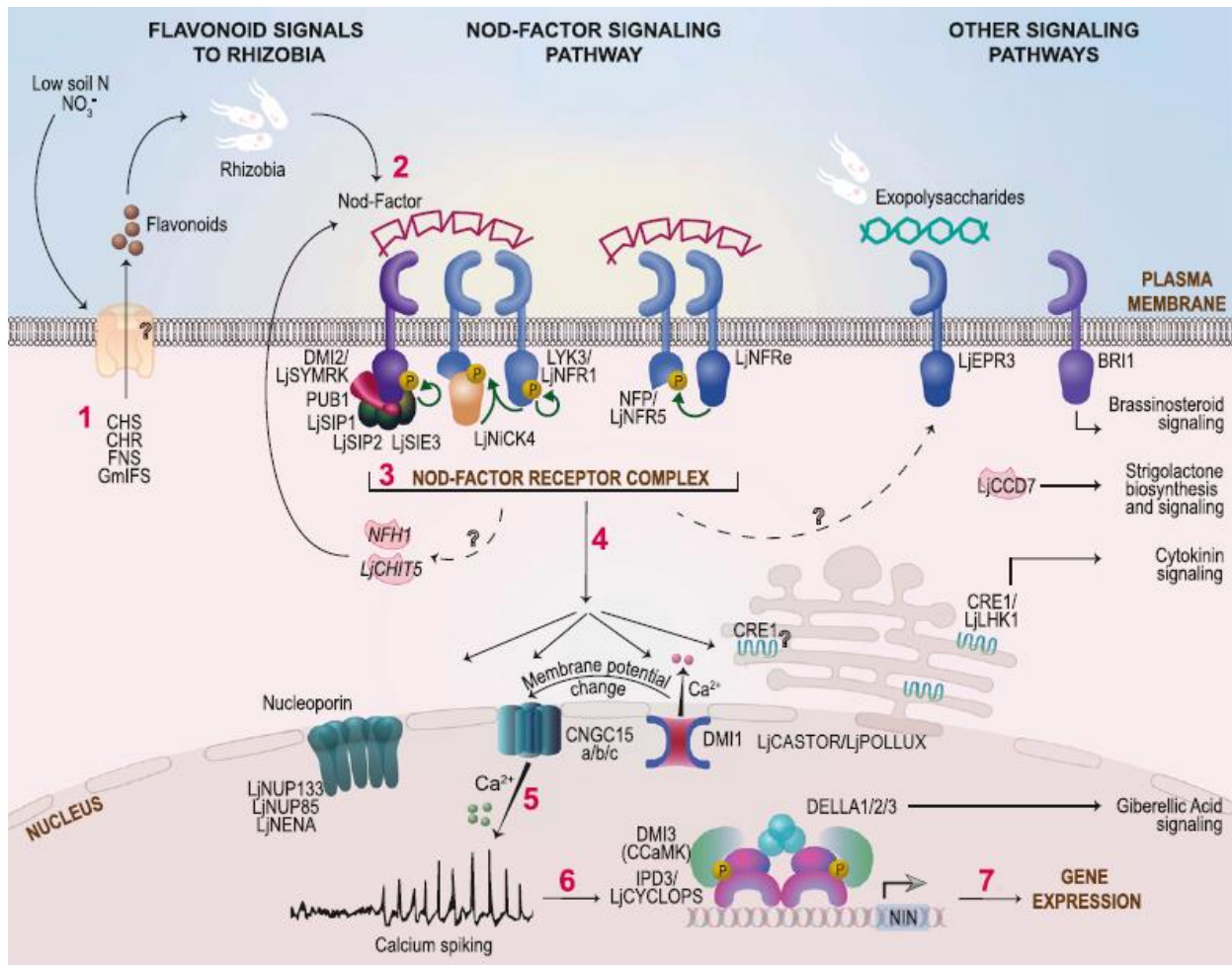


Ilustración 1. Genes y procesos involucrados en la señalización temprana durante la nodulación (Imagen tomada y modificada de Roy *et al.*, 2019). Los flavonoides producidos por las plantas en condiciones de deficiencia de nitrógeno (1) promueven la producción de factores Nod rizobiales (2) que, junto a otras señales son percibidos por receptores en la membrana plasmática de las células epidermales (3). La percepción de factores Nod desencadena la vía de señalización común simbiótica que lleva a cambios fisiológicos y bioquímicos (4-6) que resultan en cambios en la expresión de genes en el núcleo para permitir la nodulación (7).

Cuando los rizobios alcanzan la punta del pelo radical y se adhieren, el pelo radical se enrolla alrededor de estas bacterias atrapándolas en las cámaras de infección, que eventualmente contienen microcolonias de bacterias en división. La entrada de los rizobios a través del pelo radicular es un paso crítico que involucra un estallido de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) acompañada de la degradación de la pared celular del pelo donde posteriormente se genera una invaginación de la membrana plasmática que forma un túbulo llamado hilo de infección (HI). Este es un proceso dinámico que requiere de varios componentes del citoesqueleto para la reorientación del crecimiento polar del pelo radical y el desarrollo del hilo de infección como lo son el complejo SCAR/WAVE y el complejo ARP2/3 encargados del rearrreglo del citoesqueleto de actina (Ilustración 2, números 1 a 4). Mutaciones en componentes del complejo SCAR/WAVE, afectan la infección de rizobios, pero no afectan la organogénesis de nódulos, en *LjNap1*, *LjPir1* y *Ljscarn*, se forman pocos hilos de infección y además la mayoría

se abortan de manera prematura y liberan las bacterias dentro del pelo radicular (Roy et al., 2020).

Después, el hilo de infección se llena con bacterias en división que se propagan desde la superficie hasta las células del córtex. Investigaciones recientes apuntan a la existencia de un complejo en la punta del hilo de infección llamado “infectosoma” compuesto por MtVPY y sus interactores MtLIN y MtEXO70 H4 que aseguran el crecimiento polar del hilo de infección hacia la corteza del nódulo (Ilustración 2, número 5), mutaciones en cualquiera de estos tres componentes causan defectos en la elongación del hilo de infección. Al mismo tiempo, varios cambios transcripcionales y postraduccionales junto con la ruta de autofagia aseguran el acomodo del simbionte dentro del huésped (Roy et al., 2020).

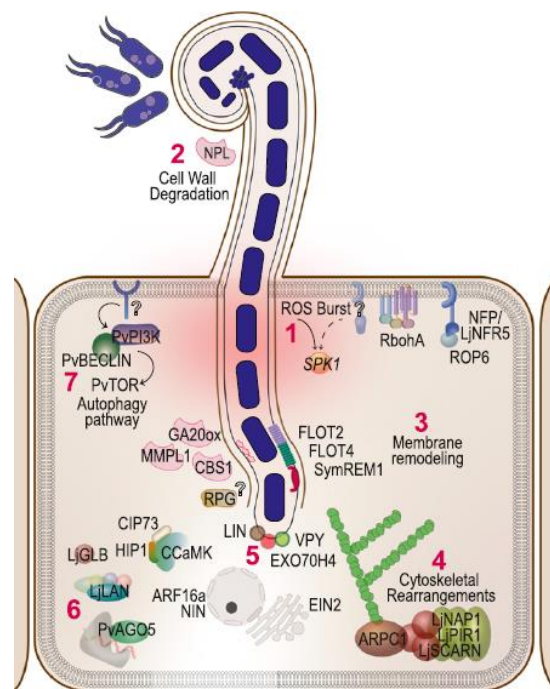


Ilustración 2. Infección rizobial (Tomada de Roy *et al.*, 2019) . (1) La entrada de rizobia en la célula de la planta a través de hilos de infección (HI) tubulares desencadena una explosión transitoria de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto se acompaña de degradación de la pared celular (2), remodelado de la membrana (3) y reordenamientos del citoesqueleto (4). El HI está dirigido por un complejo en su punta llamado infectosoma (5). Paralelamente, varios cambios transcripcionales y postraduccionales (6) y la ruta de autofagia (7) aseguran el acomodo del simbionte dentro del huésped de la planta.

Al mismo tiempo que el hilo de infección se extiende, ocurren divisiones celulares en el córtex y periciclo de la raíz para formar los primordios de nódulos (Ilustración 3, números 1 a 4). Cuando el hilo de infección alcanza la corteza del nódulo, se ramifica y libera los rizobios en las células vegetales a través de “gotas” de infección llamadas simbiosomas, donde las bacterias están rodeadas de membrana derivada de la célula vegetal llamada “membrana peribacteroidea”.

Dentro de los simbiosomas, las bacterias se diferencian a bacteroides fijadores de nitrógeno (Ilustración 3, número 5). La diferenciación bacteriana involucra cambios en el volumen y el tamaño, en el contenido de ADN por endoreduplicación y en los bacteroides de *M. truncatula* la pérdida de viabilidad como organismos de vida libre (Mergaert *et al.*, 2006). Durante este proceso se ha encontrado que las vías de exocitosis y endocitosis son importantes para que ocurra de manera exitosa la liberación de las bacterias y la maduración de los simbiosomas, además de ser un proceso dinámico que requiere el reacomodo del citoesqueleto de actina (Roy *et al.*, 2020). Las divisiones celulares en el primordio de nódulo continúan, así como la invasión por los rizobios y su diferenciación hasta que se forman nódulos maduros (Ilustración 3, números 6 y 7), espacios ideales para que los rizobios puedan llevar a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico a través de la actividad de la nitrogenasa (Roy *et al.*, 2020), enzima que se inactiva con el oxígeno, por lo que se reduce la concentración de oxígeno con la ayuda de leghemoglobinas que se unen al oxígeno y lo transportan en el citoplasma de las células infectadas (Ott *et al.*, 2005). Además, la planta proporciona fotosintatos y otros metabolitos esenciales para la supervivencia de los rizobios para lograr una simbiosis fijadora de nitrógeno exitosa.

Existen dos tipos principales de nódulos en las leguminosas, determinados e indeterminados. Las diferencias entre los dos tipos de nódulos son: el sitio de las primeras divisiones internas, el mantenimiento de una región meristemática y la forma del nódulo maduro. En los nódulos indeterminados las primeras divisiones celulares son anticlinales y ocurren en el córtex interno (Ilustración 3, número 1), seguido de divisiones periclinales en la endodermis y el periciclo, estas divisiones llevan a la formación del primordio de nódulo. Tienen un meristemo persistente lo que resulta en nódulos de forma alargada o cilíndrica, donde en el meristemo apical se producen continuamente nuevas células que se infectan con rizobios, esto conlleva a la organización de un gradiente de zonas de desarrollo dentro del nódulo maduro indeterminado: la zona meristemática, la zona de infección, zona de fijación de nitrógeno y la zona de senescencia (Ilustración 3, número 7). Un ejemplo de leguminosa que forma este tipo de nódulos es *M. truncatula* (Ferguson *et al.*, 2010). Por otra parte, en los nódulos determinados las primeras divisiones ocurren de manera sub-epidermal en el córtex externo (Ilustración 3, número 1). Carecen de un meristemo persistente, por lo que la forma de los nódulos maduros determinados es más bien esférica y no tienen un gradiente de desarrollo obvio, tienen una población de bacteroides fijadores de nitrógeno relativamente homogénea (Ilustración 3, número 7). Los nódulos maduros determinados también desarrollan unas estructuras llamadas lenticelas que mejoran el intercambio de gases (Ilustración 3, número 7). *L. japonicus* forma nódulos determinados (Ferguson *et al.*, 2010).

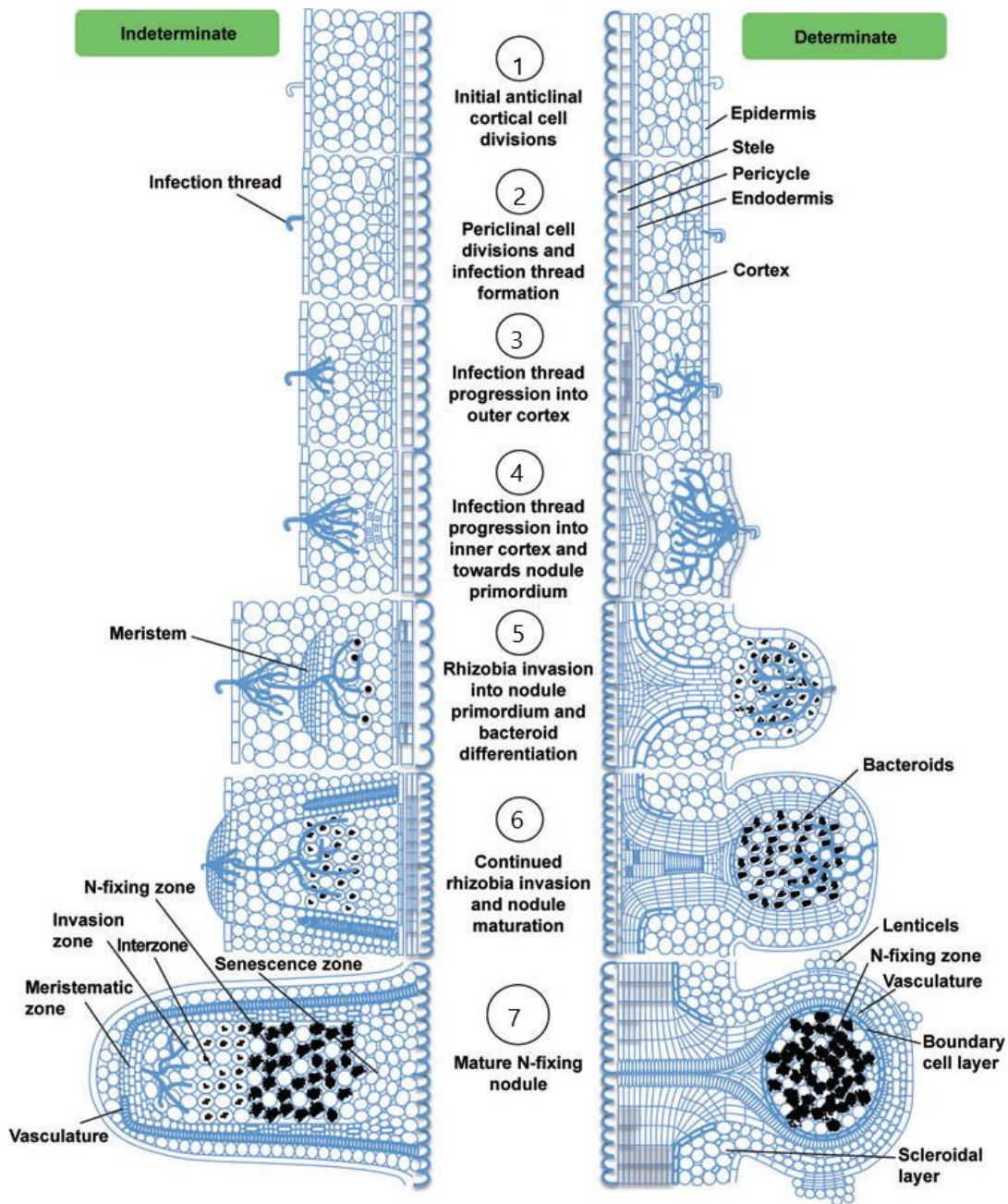


Ilustración 3. Estados del desarrollo de nódulos determinados e indeterminados en leguminosas (Tomada y modificada de Ferguson *et al.*, 2010). El hilo de infección inicia en la cámara de infección propiciando la entrada de los rizobios a la planta. Las primeras divisiones celulares se observan en el córtex interno en el desarrollo de nódulos indeterminados y en la capa celular sub-epidermal en el desarrollo de nódulos determinados (1). Adicionalmente, otras capas celulares se dividen para dar lugar a la formación del primordio de nódulo (2-4), el hilo de infección progresa hasta este primordio y libera los rizobios en “gotas de infección” donde los rizobios se diferencian a bacteroides fijadores de nitrógeno (5 y 6). En la punta de los nódulos indeterminados se desarrolla un meristemo que continuamente produce nuevas células, estas nuevas células serán infectadas posteriormente lo que conlleva a una diferenciación de zonas de desarrollo a lo largo del nódulo. En contraste, los nódulos determinados no desarrollan un meristemo persistente, por lo que todas las células infectadas están en una fase de desarrollo similar y la forma del nódulo es distinta (7).

El establecimiento de la simbiosis no solo está regulado a nivel transcripcional, también está regulado por hormonas. La señalización de auxina y la citocinina promueven el desarrollo de hilos de infección y la organogénesis del nódulo, mientras que el etileno, el ácido jasmónico y el ácido giberélico contrarrestan la infección rizobial y la formación de nódulos (Ilustración 4, números 1 a 3). La mutante *Mtskl*, dañada en EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE2) una proteína anclada al retículo endoplásmico crucial para la señalización de etileno exhibe una proliferación masiva de hilos de infección y primordios de nódulos, aunque rara vez se convierten en nódulos maduros (Roy et al., 2020). A medida que el primordio se convierte en un nódulo maduro, los requerimientos hormonales difieren entre los nódulos indeterminados y determinados, mientras que en la maduración de nódulos indeterminados se requiere de brasinoesteroides, citocininas y auxinas, en los nódulos determinados la regulación hormonal está dada por citocininas, auxinas, estrigolactonas y ácido jasmónico (Ilustración 4, números 5 y 6) (Liu et al., 2018; Roy et al., 2020).

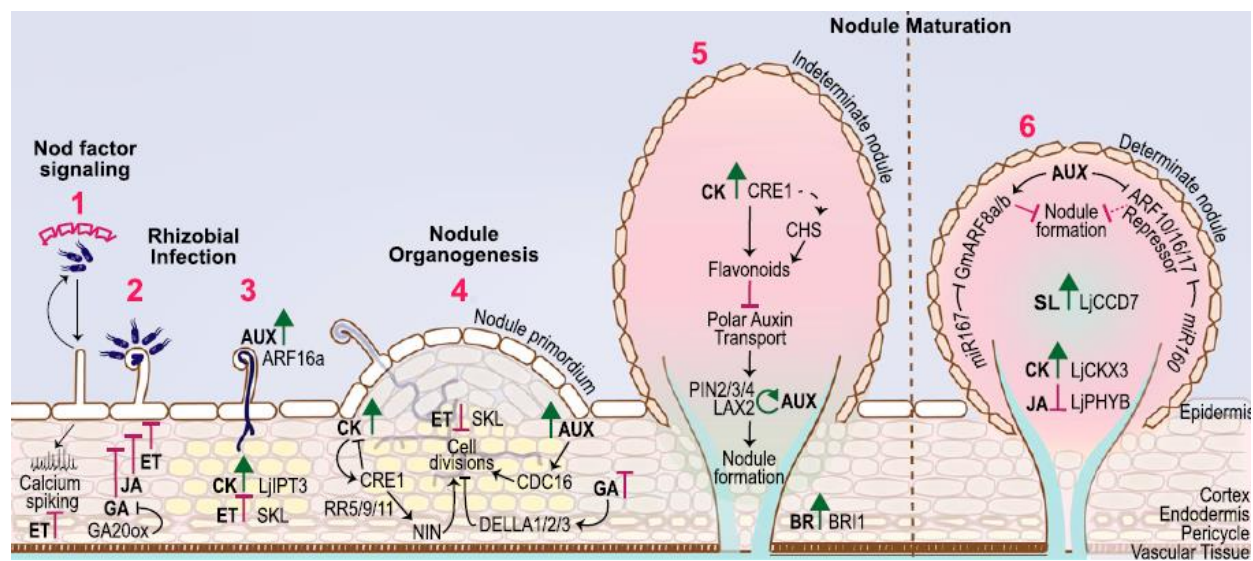


Ilustración 4. Control hormonal de la fijación simbiótica de nitrógeno. (Ilustración tomada de Roy et al., 2019). Etileno, ácido giberélico y ácido jasmónico regulan negativamente las primeras etapas del establecimiento de la simbiosis, hasta la organogénesis del nódulo, mientras que auxina y citocinina regulan positivamente en estas etapas (1-4). A medida que el primordio se convierte en un nódulo maduro, los requerimientos hormonales difieren entre los nódulos indeterminados y determinados (5 y 6). ET: Etileno; GA: Acido Giberélico; JA: Acido Jasmónico; AUX: Auxina; BR: Brasinoesteroides; SL: Estrigolactonas. Los roles positivos y negativos se muestran en verde y magenta, respectivamente. Se muestran los nombres de genes de Medicago, a menos que se indique lo contrario.

Dado que la formación y el mantenimiento de los nódulos requiere de muchos recursos, las plantas regulan el número de nódulos que se forman. Una de las maneras para regular el número de nódulos es a través de la vía de señalización sistémica de larga distancia conocida como "Autorregulación de la nodulación" (AON, por sus siglas en inglés). En la AON, se producen péptidos CLE (siglas en inglés de CLAVATA-Endosperm Surrounding Region (ESR)-related), en soya (*Glycine max*) estos péptidos son codificados por los genes RIC (siglas en inglés de Rhizobia-induced CLE) y en *L. japonicus* sus ortólogos son LjCLE-RS1 y LjCLE-RS2, estos genes están regulados por NIN (siglas en inglés de Nodule inception) (Ferguson et al., 2019).

Los péptidos CLE viajan desde la raíz hasta el tallo y las hojas a través de la xilema, ahí son reconocidos por un complejo receptor llamado LjHAR1. La percepción de los péptidos CLE derivan en una señal proveniente del tallo (probablemente citocininas, miR2111 u otra señal) que llega a las raíces a través del floema y que interactúa con otros factores como TML (siglas de Too Much Love) y NIN que controla la expresión de CLE para regular futuros eventos de nodulación (Ferguson et al., 2019; Roy et al., 2020). Las leguminosas también regulan negativamente la formación de nódulos mediante retroalimentación local en las raíces cuando existe suficiente nitrógeno disponible en el suelo (Ferguson *et al.*, 2019).

Citoesqueleto en células vegetales.

En las células vegetales, el citoesqueleto está conformado por microtúbulos y filamentos de actina. Los microtúbulos (MT) se forman por heterodímeros de α - y β -tubulina que se polimerizan en presencia de Mg^{2+} y trifosfato de guanosina (GTP). *In vivo* la polimerización es nucleada en centros de organización de microtúbulos (MTOC, por sus siglas en inglés) y regulada por proteínas asociadas a microtúbulos (MAP, MT-Associated Proteins). Los microtúbulos de las plantas están en gran parte organizados en paquetes y a menudo están estrechamente asociados con la corteza celular. Se conocen 5 conjuntos principales de MT: el arreglo de interfase que consiste en microtúbulos corticales, la banda de pre-profase, el aparato mitótico, el fragmoplasto y el conjunto perinuclear representados en la ilustración 5 (Timmers, 2008).

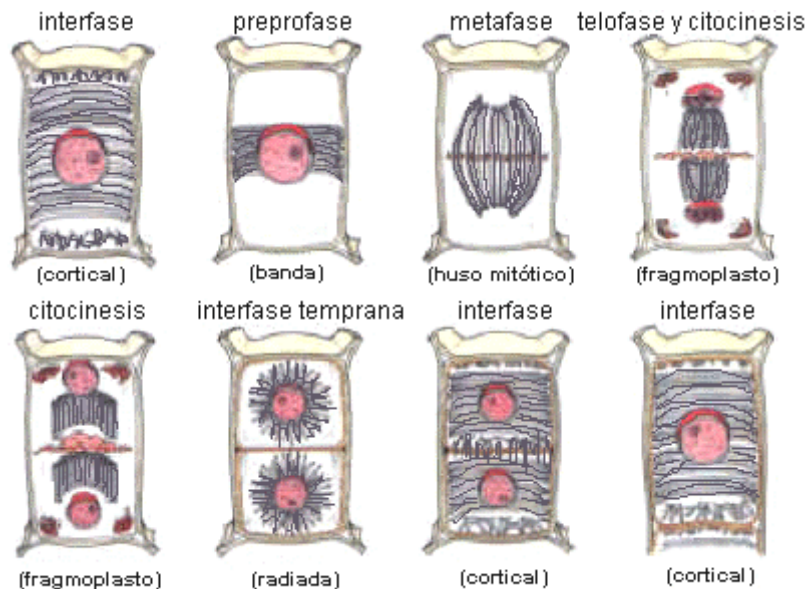


Ilustración 5. Cambios en la organización de microtúbulos en células vegetales. La organización de microtúbulos dentro de la célula vegetal es variable, dependiendo del estado de la célula. Durante la interfase el arreglo de microtúbulos es cortical. Durante la preprofase, los microtúbulos corticales se sitúan en el medio formando una banda. Posteriormente, se forma el aparato mitótico durante la metafase. Luego se forma el fragmoplasto durante la telofase y la citocinesis. Durante la interfase temprana, los microtúbulos se encuentran alrededor del núcleo de manera radiada (conjunto

perinuclear). Finalmente, cuando las células se dividen y vuelven a entrar en interfase el arreglo de microtúbulos vuelve a ser cortical.

Los filamentos de actina se forman por la polimerización de monómeros de actina en presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y trifosfato de adenina (ATP). Se han reportado varios arreglos de filamentos de actina en interfase, los más comunes son los grandes haces citoplasmáticos orientados de forma paralela al eje largo de la célula o en hebras transvacuolares y un conjunto de filamentos de actina perinuclear. Las proteínas de unión a actina (ABP) juegan un papel importante en la formación y orientación de los filamentos de actina en la célula. Estas redes citoesqueléticas de microtúbulos y filamentos de actina son fundamentales en diversos procesos, incluyendo la división celular, morfogénesis y tráfico vesicular. También se sabe que están en constante reorganización a través de la polimerización y despolimerización de sus subunidades, ya sea en respuesta a estímulos externos abióticos (luz, gravedad, estrés osmótico, presión, temperatura) o durante la interacción con microorganismos, e incluso en ausencia de estímulos externos (Sampathkumar *et al.*, 2011; Timmers, 2008).

Durante el proceso para el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno, entre leguminosas y rizobios, se ha encontrado que el reacomodo del citoesqueleto es un factor crucial para formar una simbiosis exitosa. Se ha descrito que el reacomodo del citoesqueleto de actina, a través del complejo SCAR/WAVE y ARP 2/3 (que permiten la ramificación de filamentos de actina), es necesario para que se pueda formar correctamente el hilo de infección en los pelos de la raíz de *L. japonicus* (Hossain *et al.*, 2012; Yokota *et al.*, 2009). Además, recientemente se encontró que el citoesqueleto de actina también posee un reacomodo dinámico durante la liberación de rizobios dentro de las células vegetales y la diferenciación del simbiosoma en los nódulos de *M. truncatula*. Debido a que se observaron matrices densas de filamentos de actina canalizando el alargamiento de los hilos de infección y la liberación de gotas de infección (Ilustración 6a), una red de filamentos de actina rodeando los simbiosomas recién liberados (Ilustración 6b) y fragmentos cortos de filamentos y puntos de actina que se distribuyen radialmente alrededor de los simbiosomas maduros (Ilustración 6c) (Genre y Timmers, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

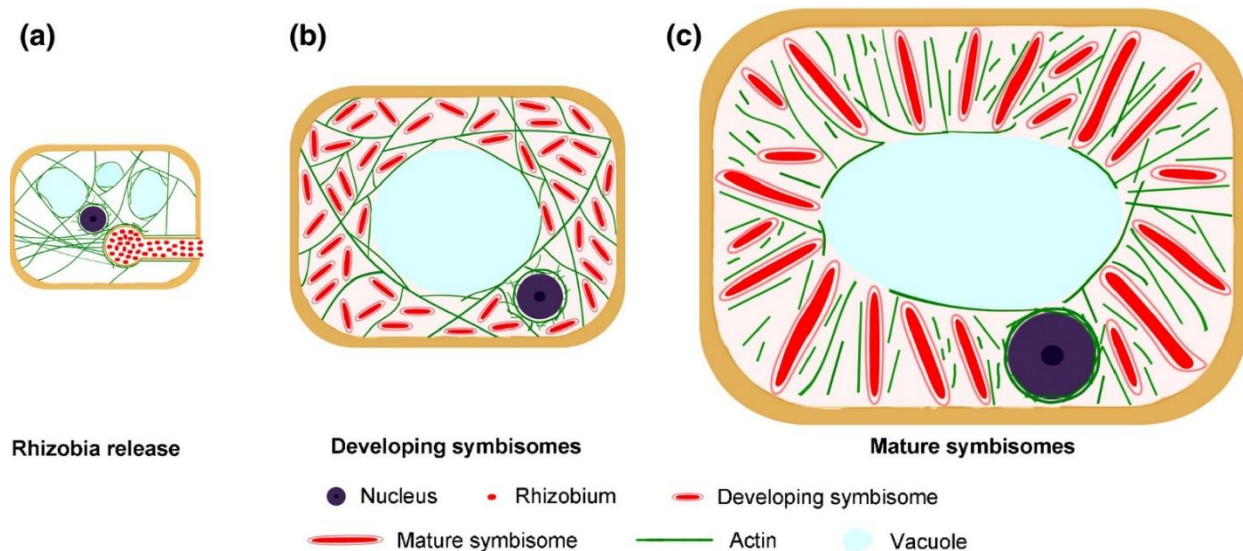


Ilustración 6. Organización de filamentos de actina durante el establecimiento de la liberación de rizobios en *M. truncatula* (Imagen tomada de Genre y Timmers, 2019). Matrices densas de filamentos de actina canalizan el alargamiento del hilo de infección y la liberación de gotas de infección (a), posteriormente una matriz de actina rodea los simbiosomas recién liberados (b) y en las células con simbiosomas maduros, fragmentos cortos y puntos de actina se distribuyen radialmente alrededor de los simbiosomas maduros (c).

Por otro lado, se ha encontrado que la liberación de bacterias y el posicionamiento del bacteroide correlacionan con arreglos característicos de los microtúbulos; por ejemplo, que la infección bacteriana y la formación de gotas de infección están apoyadas por microtúbulos endoplásmicos, mientras que la liberación bacteriana coincide con un cambio en la organización de los MT corticales de las matrices paralelas en una disposición entrecruzada irregular. Así mismo, después de la liberación, la organización de los MT endoplásmicos está vinculada a la distribución de simbiosomas (Ilustración 7) (Kitaeva *et al.*, 2016).

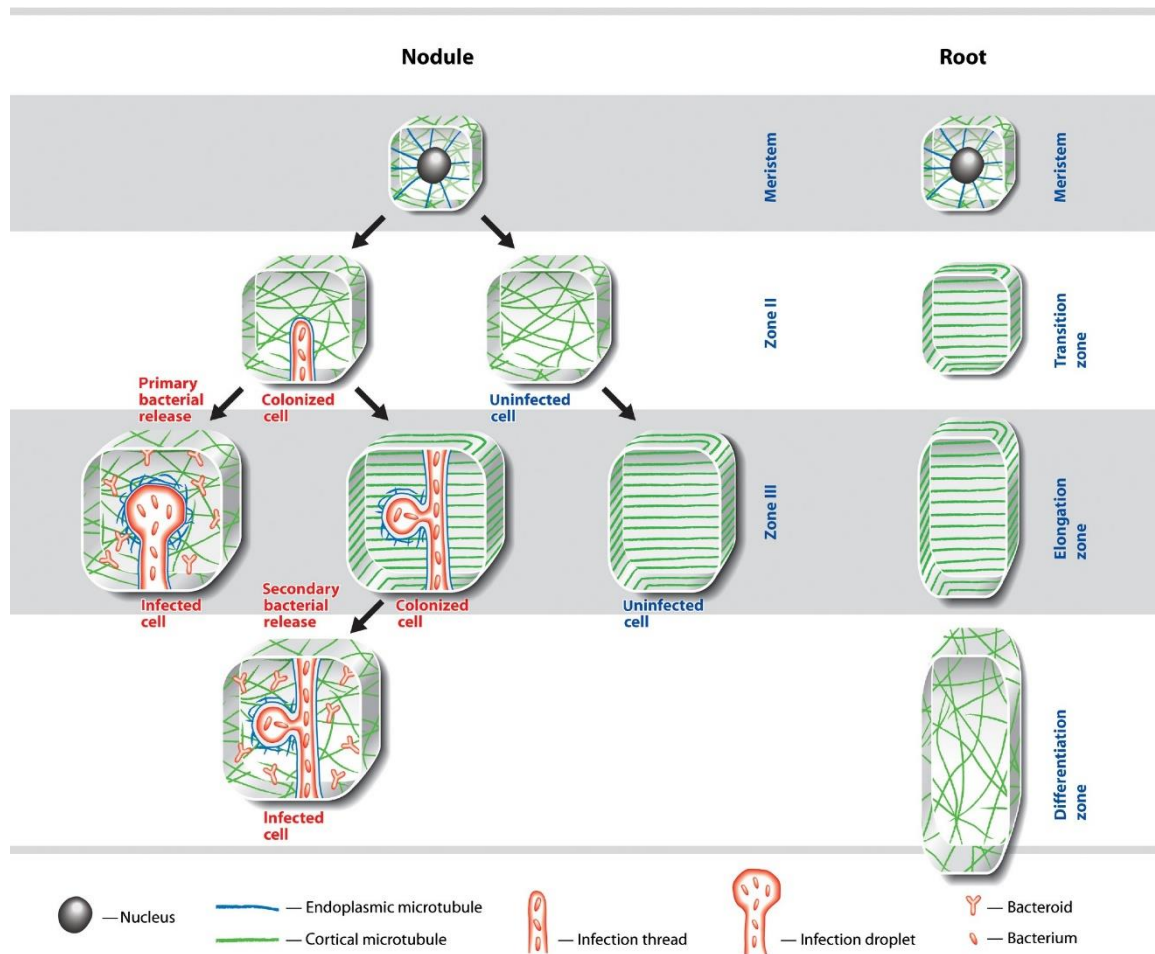


Ilustración 7. Comparación de la organización de microtúbulos en raíces y nódulos de *M. truncatula* (Imagen tomada de Kitaeva *et al.*, 2016). La organización de microtúbulos dentro de las células es variable, de acuerdo con la zona de la raíz o del nódulo en la que se encuentre. En células meristemáticas tanto de nódulos como de la raíz, los microtúbulos corticales están distribuidos en una matriz entrecruzada y los microtúbulos endoplásmicos se distribuyen de manera radial alrededor del núcleo, en células colonizadas e infectadas, los microtúbulos endoplásmicos rodean el hilo de infección y se acumulan alrededor de las gotas de infección, mientras que los microtúbulos corticales pasan de estar en una matriz entrecruzada en células de las zonas I y II a una conformación de haces paralelos en células colonizadas y células no infectadas de la zona III.

Rho GTPasas: regulación y efectores.

Se sabe que el establecimiento de los rizobios dentro de las células vegetales es un proceso dinámico que requiere del reacomodo del citoesqueleto (Yokota *et al.*, 2009). En levaduras y mamíferos, el principal regulador de la ramificación de actina ARP2/3 es activado por el complejo SCAR/WAVE, el cual a su vez es activado por pequeñas GTPasas de tipo Rho. Las Rho-GTPasas son pequeñas proteínas señalizadoras que se consideran “interruptores moleculares”. Estas proteínas están inactivas cuando se encuentran unidas a GDP, pero en respuesta a señales específicas, las enzimas (Rho-GEF) pueden hacer que las Rho-GTPasas se unan a GTP. Al unirse a GTP, las Rho-GTPasas cambian su conformación pasando a un estado activo

que desencadena cascadas de señalización al interactuar con sus efectores. Las Rho-GTPasas activas también interactúan con las proteínas Rho-GAP que llevan a cabo la hidrólisis del GTP, esto le permite a las Rho-GTPasas volver a su estado inactivo (Ilustración 8) (Craddock *et al.*, 2012).

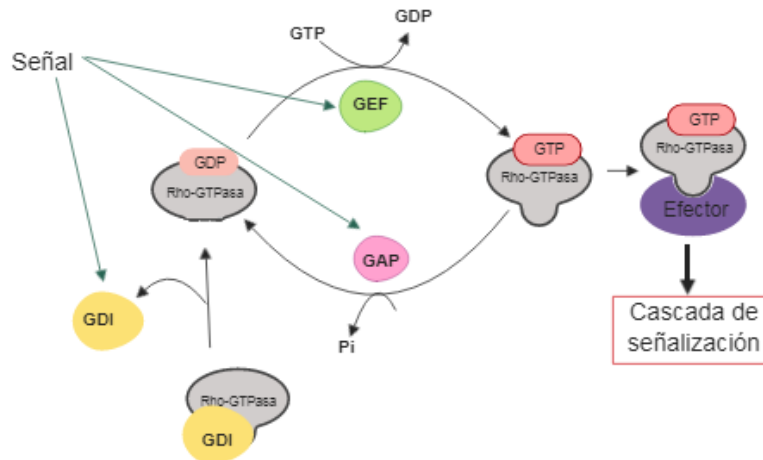


Ilustración 8. Representación esquemática de activación/desactivación de Rho GTPasas. Las Rho.GTPasas se encuentran generalmente inactivas unidas a las proteínas Rho-GDI que las ayudan a mantener su estructura. Cuando se detecta una señal, las Rho-GDI liberan a las Rho-GTPasas y las Rho-GEF llevan a cabo el intercambio de GDP a GTP en las Rho-GTPasas, una vez unidas a GTP se encuentran en su estado activo, donde son capaces de unirse a sus efectores y desencadenar cascadas de señalización. También en su estado activo pueden interactuar con las Rho-GAP que hidrolizan el GTP de las Rho-GTPasas lo que les permite volver a su estado inactivo.

En las plantas, estas proteínas se denominan Rho-GTPasas de plantas (ROP, por sus siglas en inglés) y se sabe que al interactuar con sus efectores pueden desencadenar cascadas de señalización para regular la dinámica del citoesqueleto, la producción de especies reactivas de oxígeno y el desarrollo de la pared celular como se muestra en la ilustración 9 (Berken, 2006).

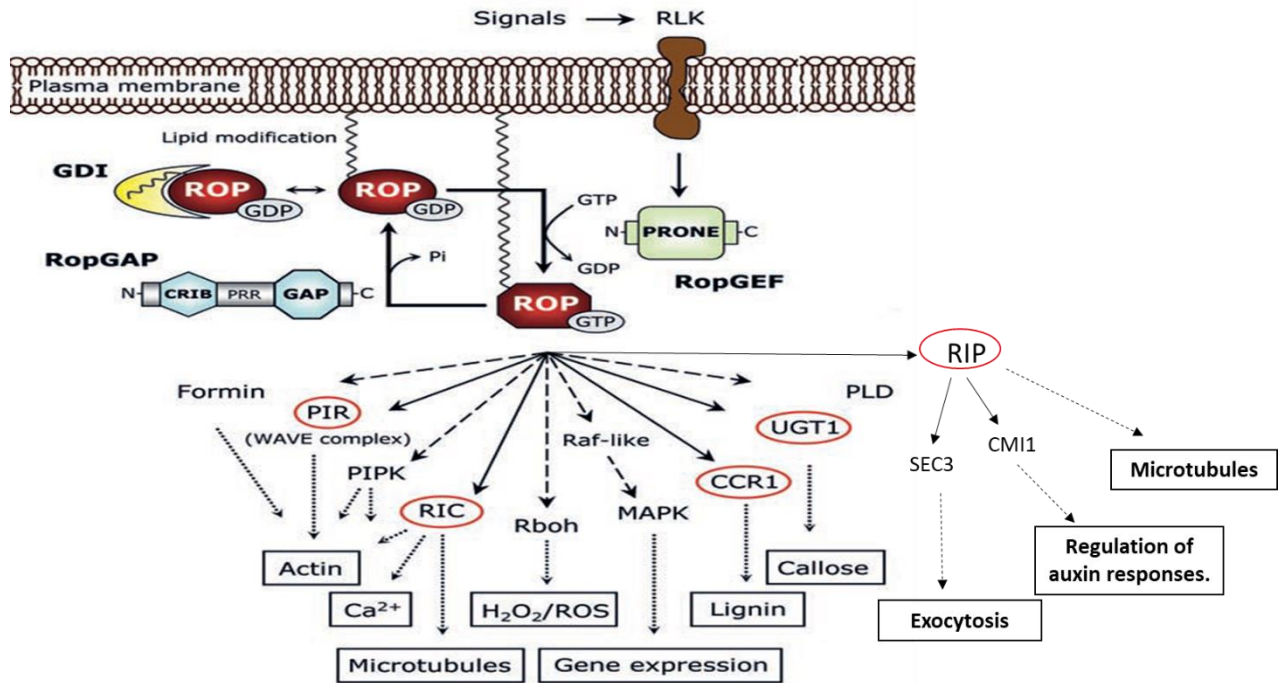


Ilustración 9. Señalización dependiente de ROP (Imagen tomada y modificada de Berken, 2006). Las proteínas ROP en su estado activo, unidas a GTP, son capaces de interactuar con sus proteínas efectoras para desencadenar vías de señalización involucradas en la regulación de diversos procesos, incluyendo la reorganización de componentes del citoesqueleto, producción de especies reactivas de oxígeno, expresión génica entre otros. Los enlaces a objetivos ROP hipotéticos o indirectos se muestran con flechas discontinuas. CCR: Cinnamoyl-CoA reductase; CMI1: Ca²⁺-dependent modulator of ICR1; MAPK: mitogen-activated protein kinase; PIPK: phosphatidylinositol monophosphate kinase; PIR: p53-inducible RNA; PLD: phospholipase D; Rboh: respiratory burst oxidase homologue; RIC: ROP-interactive CRIB motif-containing protein; RIP: ROPs Interactor Proteins; UGT: UDP-glucose transferase.

Los efectores de interés en este proyecto (RIC y RIP), se han descrito anteriormente en *A. thaliana* donde participan en la dinámica del citoesqueleto durante el crecimiento polar del tubo polínico y el crecimiento difuso en la interdigitación de células del pavimento de las hojas (Feiguelman *et al.*, 2018).

Proteínas RIC.

Las proteínas RIC (siglas de: ROP Interactive CRIB Motif Containing Proteins), se describieron por primera vez en *A. thaliana* en el año 2001 (Wu *et al.*, 2001). Comparten un dominio conservado hacia el extremo N-terminal denominado CRIB, este dominio también está presente en las proteínas GAPs, sin embargo, difieren en algunos aminoácidos en su secuencia que nos permite diferenciar ambos grupos, resaltados en el recuadro rojo de la ilustración 10 (Nagawa *et al.*, 2010).

RIC1 (A.t.)	IGFPTDVKHVAHIGSD
RIC2 (A.t.)	IGFPTDVKHLSHIGVD
RIC3 (A.t.)	IGFPTDVKHVAHIGSD
RIC4 (A.t.)	IGVPTNVKHVSHIGWE
RIC5 (A.t.)	IGIPTDVKHVAHIGWE
RIC6 (A.t.)	IGNPTDVKHVAHIGWD
RIC7 (A.t.)	IGNPTDVKHVAHIGWD
RIC8 (A.t.)	IGTPTDVKHVAHIGWD
RIC9 (A.t.)	IGYPTDVRHVAHIGWD
RIC10 (A.t.)	IGFPTDVKHVAHIGWE
RIC11 (A.t.)	IGHPTEVKHVAHIGWG
ROPGAP1 (A.t.)	IGWPTNVRHVAHVTFD
ROPGAP2 (A.t.)	IGWPTNVRHITHVTFD
ROPGAP3 (A.t.)	IGWPTEVKHVSHVTFD
ROPGAP4 (A.t.)	ISRPTNISHVAHVTYD
ROPGAP5 (A.t.)	IGGPTNIRHVAHVTFD
ROPGAP6 (A.t.)	ISRPTNISHVAHVTYD

Ilustración 10. Dominio de interacción CRIB compartido entre proteínas RIC y GAP de *A. thaliana* (Imagen tomada y modificada de Nagawa *et al.*, 2010). El recuadro rojo resalta los aminoácidos del dominio CRIB que permiten diferenciar entre RIC y GAP de *A. thaliana*.

Se ha encontrado que varias proteínas RIC están involucradas en la interdigitación de células del pavimento de las hojas a través de la regulación de componentes del citoesqueleto en conjunto con las ROP. Por ejemplo, en *A. thaliana* ROP6 interactúa con RIC1 y ésta a su vez interactúa con una subunidad de Katanina encargada de cortar los microtúbulos para su reorganización, generando las indentaciones en las células (Fu *et al.*, 2005, 2009). También participan conjuntamente durante el crecimiento polar en el tubo polínico (Ilustración 11), de manera que, si se sobreexpresan o se generan mutaciones en estos genes, se presentan deformaciones (Gu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2015). Cabe resaltar que poco se conoce de los elementos río abajo o del mecanismo mediante el cual se regula el citoesqueleto a partir de la interacción de las ROP con las RIC. El crecimiento polar, no solamente es característico de la interdigitación de células o del crecimiento del tubo polínico, también es característico del crecimiento de los pelos radicales, por lo que probablemente la señalización a través de ROP y sus efectores RIC estará presente en este proceso.

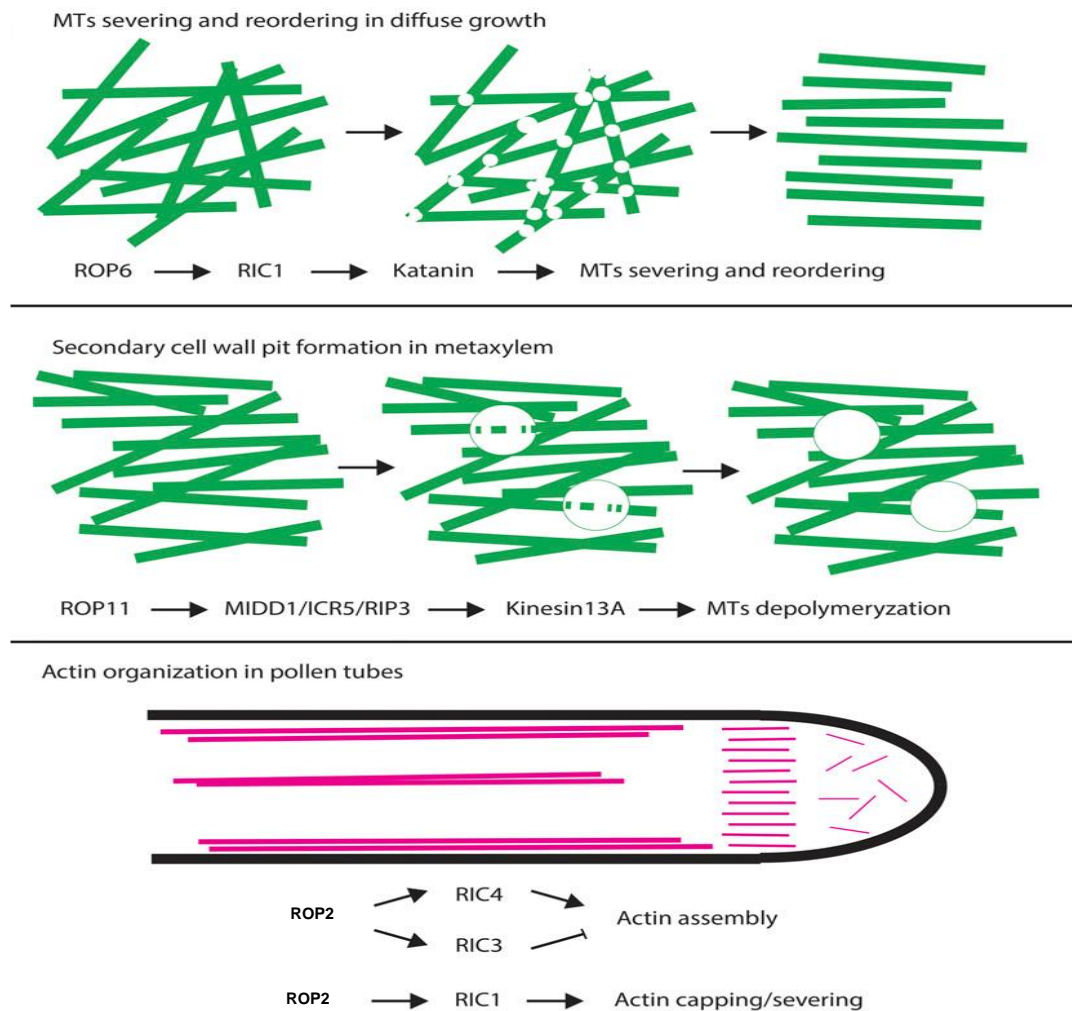


Ilustración 11. Regulación del citoesqueleto a través de la interacción de ROPs con efectores RIC y RIP (Imagen tomada y modificada de Feiguelman *et al.*, 2018). Las proteínas RIC, al interactuar con las proteínas ROP son capaces de regular la organización de microtúbulos durante el crecimiento difuso en células de las hojas (superior), también son capaces de regular la organización de filamentos de actina durante el crecimiento de los tubos polínicos (inferior). Mientras que las proteínas ICR/RIP están involucradas en la organización de microtúbulos durante la formación de la pared celular secundaria en el metaxilema (intermedio). MTs: Microtúbulos.

En el genoma de *L. japonicus* se identificaron 5 genes potenciales que codifican proteínas RIC enlistados en la tabla 1 con su número de identificación (ID por sus siglas en inglés) de acuerdo con la anotación de la base de datos Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>), (Mejía-Martínez, 2019), que muy probablemente tengan funciones como las ya descritas en *A. thaliana*. Además, podrían estar involucradas en el proceso de simbiosis fijadora de nitrógeno, sobre todo en etapas tempranas, durante la internalización de las bacterias dentro del pelo radical para la formación del hilo de infección, dado que es un proceso que requiere de una reorganización del citoesqueleto y es altamente dinámico. Desafortunadamente, aún se desconoce su función durante este proceso.

Tabla 1. Genes RIC en *L. japonicus*.

Gen	ID Lotus Base
<i>RIC1</i>	Lj1g3v0052540
<i>RIC2</i>	Lj1g3v2809540
<i>RIC3</i>	Lj1g3v3160060
<i>RIC4</i>	Lj3g3v1541350
<i>RIC5</i>	Lj4g3v3116240

Proteínas ICR/RIP.

Las proteínas ICR/RIP (siglas de: Interactor of Constitutive Active ROP / ROP interactor Proteins) se describieron por primera vez en plantas en el año 2007, presentan una región rica en lisina y el motivo QWRKAA hacia su extremo C-terminal que les permite interactuar con las ROP activas como se muestran en el recuadro punteado y el recuadro rojo de la ilustración 12 (Li *et al.*, 2008). Al igual que los efectores RIC, parecen estar relacionadas al crecimiento polar del tubo polínico y de las raíces en las plantas. Sin embargo, su función aún no se entiende completamente, algunos reportes apuntan a estas proteínas como proteínas de andamio (Bloch *et al.*, 2008; Lavy *et al.*, 2007) y en otros se les atribuye su participación en la regulación del patrón de distribución de auxina en respuesta a Ca^{2+} (Hazak *et al.*, 2014, 2019; Lavy *et al.*, 2007; Mucha *et al.*, 2010). Se ha encontrado también que están implicadas en la regulación de citoesqueleto durante la pared celular secundaria en el metaxilema al interactuar con Kinesina (Ilustración 11), una proteína que permite la reorganización de microtúbulos y también relacionada al tráfico vesicular (Feiguelman *et al.*, 2018; Mucha *et al.*, 2010).

```

ATRIP2      482 QLGAQVINTELEAEELRRLKVKQCSQURKAAEADATHLSGGNNNNNSNGKYVERTGSLESP
ATRIP3      340 -----TEAMEAEELKRYKIQCSQURKAAETDASILNND-----ERTDSIET-
TobaccoRIP1 506 ELDAAQANSEHETELRLRLKVKQCSQURKAAEADASNLISAGNN-----GKYVERTGSLDYH
ATRIP5      480 QLEATQASNSEHETELRLRLKVKQCSQURKAAEADTAMLSAGNN-----GKFAENYNQINSP
PotatoRIP1  595 QLDAQAASNAEMEAEELRRLKVKQCSQURKAAEADTAMLSAGNN-----GKLMERTGSHDSP
RiceRIP3    502 QLDAQAASVEMEAEELRRLKVKQCSQURKAAEADAAAALGGGGG---GIGRNVERTGSLEPA
RiceRIP4    855 DAAAEAAKKGEMEAEELRRLKVKQCSQURKAAETDAAALTVGKG---GNGKVDRSESLEGG
ATRIP1      241 KLESHEEAKDALEAEELRRLKVKQCSQURKAAEADAAVLSGEFEMNGR--DRSGSTEKYYAG
ATRIP4      230 KLESVEEAKETLEAEELRRLKVKQCSQURKAAEADAAVLSGGVEMNGRFSECCGSMEKHFAG
RiceRIP1    312 RLRAERAREALEAEELRRLKVKQCSQURKAAEADAAVLAAVEHGAGAPAADVEWRHSSG-
RiceRIP2    413 CLRASEAARETLEAEELRRLKVKQCSQURKAAEADAPPVIGGDAHFVG-----HNGNG-
consensus  . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

ATRIP2      542 LRR-----RNVNMSPYHGETDELSSEKPKKNGSMLEKIGVLEKPSQK-
ATRIP3      381 -----SKMLKKFGVLEKLNHK-
TobaccoRIP1 563 TIG----GKLGSPLLDDELD--SPKPKNNNMLKRIGVLEKKGQK-
ATRIP5      535 YS-----EIDIDE--LTKKKNGNVLEKIGVLEKHPQK-
PotatoRIP1  650 FSP-----CKISSPYFEDHDE--LTKKKNPNMLKRIGELEKHPLK-
RiceRIP3    559 EYINSMIGGKLASSPFSDEPEEE--SKKRNNGVLRMSGLEKNSPK-
RiceRIP4    912 GGG----GGKYAGLWDELDD--AAAKKNGNVLRRISCHLKH----
ATRIP1      299 GFFDPSAGFMDPPGMADYDGLGSGKRSKSSG--HKMFGELEKHKGQK
ATRIP4      290 -----RFVGSFGMADSDS--GSGKRSKSSG--KENFGDELEKHKGQK
RiceRIP1    371 -----AAAGERVAKDTDEHHVSGSKRNSGGARRHLSELEKPKAKQK
RiceRIP2    463 -----UGSPATMPDLCDEEGFGGKRGAG--TERMLGDELEKHKGSK
consensus  . . . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Ilustración 12. Alineamiento de secuencias del extremo C-terminal de proteínas RIP en distintas especies (Imagen tomada y modificada de Li *et al.*, 2008). Las proteínas ICR/RIP presentan una región rica en lisina (destacada con el recuadro punteado y el motivo QWRKAA que se destaca en el recuadro rojo hacia su extremo C-terminal que les permite interactuar con las ROPs activas. El subrayado negro indica aminoácidos idénticos y el subrayado gris indica aminoácidos conservados.

En el genoma de *L. japonicus*, se identificaron 7 genes potenciales que codifican proteínas RIPs enlistados en la tabla 2 con su "ID" de acuerdo a la anotación de la base de datos Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>), estos miembros se nombraron de acuerdo con su posición en el genoma (Mejía-Martínez, 2019). Si estas proteínas están relacionadas a la regulación de citoesqueleto, distribución de auxina en respuesta a Ca²⁺ y tráfico vesicular, podrían tener un papel importante durante la simbiosis fijadora de nitrógeno que se da entre leguminosas y rizobios, en conjunto con la señalización de los efectores RIC a través de las proteínas ROP. Sin embargo, aún se desconoce si estos efectores tienen un papel durante la simbiosis.

Tabla 2. Genes RIP en *L. japonicus*.

Gen	ID Lotus Base
RIP1	Lj0g3v0024499
RIP2	Lj0g3v0137099
RIP3	Lj0g3v0317209
RIP4	Lj0g3v0343269
RIP5	Lj3g3v1015390

RIP6	Lj3g3v2310030
RIP7	Lj5g3v0616420

***L. japonicus* como modelo de estudio.**

En este proyecto utilizamos como modelo la leguminosa *L. japonicus*, debido a que se pueden realizar estudios sobre interacciones simbióticas con las bacterias fijadoras de nitrógeno (*M. loti*) y a su potencial para realizar estudios de genética reversa. El tamaño de su genoma es relativamente pequeño, de 470 Mb aproximadamente, tiene un genoma diploide totalmente secuenciado con 6 cromosomas y un ciclo de vida corto, de 2 a 3 meses. Se pueden generar raíces transformadas e incluso plantas completamente transgénicas (Stiller *et al.*, 1997). Además, cuenta con una base de datos exclusiva (Lotus Base <https://lotus.au.dk/>) y con un catálogo de mutantes de inserción LORE1 (Małolepszy *et al.*, 2016). En la herramienta “Expression Atlas” (<https://lotus.au.dk/expat/>) podemos encontrar datos de la respuesta transcriptómica de *L. japonicus* frente a distintas bacterias que van desde simbioses hasta patógenos obtenidos mediante RNAseq por Kelly y colaboradores en 2018. En el laboratorio del Dr. Alexandre Tromas se cuenta con mutantes simples de inserción (LORE1) para varios genes de proteínas RIC y RIP, de los cuales las líneas parentales M2 ya fueron genotipificadas. Además, se realizaron ensayos preliminares de fenotipificación para una línea mutante *ric* y una línea mutante *rip*, donde se observó una disminución del número de hilos de infección 7 días posteriores a la inoculación (DPI) y un menor número de nódulos 7 y 21 DPI (Mejía-Martínez, 2019).

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo pretendemos identificar y caracterizar líneas mutantes de los efectores RIC y RIP en *L. japonicus* que presenten fenotipos distintos a la línea silvestre durante la simbiosis fijadora de nitrógeno con su rizobio compatible *M. loti*. De esta manera podremos aportar información que eventualmente permita elucidar el rol de estas proteínas en el contexto de la simbiosis rizobios-leguminosa.

HIPÓTESIS

En *Lotus japonicus* las proteínas efectoras RIC1, RIP3, RIP5 y RIP7 participan en la simbiosis fijadora de nitrógeno con *Mesorhizobium loti*.

OBJETIVOS

- Caracterización fenotípica de las líneas mutantes *ric* y *rip* durante la simbiosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar el genotipo de plantas mutantes *ric* y *rip* en la generación M3.
- Comparar el número de hilos de infección a 7 DPI entre plantas silvestres y mutantes.
- Comparar el número de nódulos a 7 DPI y 28 DPI entre plantas silvestres y mutantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico.

Se trabajó con *L. japonicus* del ecotipo Gifu (WT), y las líneas mutantes de *L. japonicus ric1.1*, *rip3.1*, *rip3.2*, *rip5.1*, *rip7.2* y *rip7.3* en la generación M2 y M3. Las plantas se cultivan bajo condiciones controladas de fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 21°C. Las líneas se adquirieron a través de la base de datos de *L. japonicus* (<https://lotus.au.dk/lore1/search>), las semillas recibidas son de la generación M2, una población genotípicamente heterogénea para el gen de interés (homocigotas mutantes, heterocigotas y homocigotas silvestres). Se utilizaron bacterias *M. loti* MAFF303099 que expresan constitutivamente el gen reportero *LacZ*, se cultivaron en medio TY adicionado con 15 µg/ml de Tetraciclina a 28°C durante 48 h, antes de la inoculación. El volumen del cultivo se determinó de acuerdo con el número de plantas a inocular. Una vez que el cultivo alcanzó una D.O._{600nm} de 0.8, se centrifugó a 2 500 rpm durante 10 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante cuidadosamente y al final las bacterias fueron resuspendidas en agua potable al mismo volumen que el cultivo inicial.

Extracción de ADN genómico.

Se extrajo ADN genómico con CTAB de las plantas mutantes *ric* y *rip* de la generación M2 y M3. Para ello, se colocó una hoja trifoliar joven de buen tamaño de cada planta en microtubos de 1.5 ml conteniendo 250 µl de CTAB, se trituraron con ayuda de un pistilo y se mezclaron mediante vortex, se colocaron a 60°C durante 20 minutos, mezclando en vortex cada 10 minutos. Después, se añadieron 200 µl de cloroformo a cada muestra y se centrifugaron durante 2 minutos; se recuperó la fase acuosa en microtubos de 1.5 ml que contenían 140 µl de isopropanol a 4°C, se centrifugaron durante 10 minutos, luego se retiró el sobrenadante por decantación y se procedió al lavado del pellet con 700 µl de etanol 70%. Se centrifugó durante un minuto y se retiró el sobrenadante por decantación, posteriormente se añadieron 250 µl de etanol 100%, se centrifugó durante un minuto y se decantó el sobrenadante con mucho cuidado de no perder el pellet. Se dejaron evaporar los restos de etanol colocando los tubos abiertos

durante 5 minutos a 55°C y finalmente se hidrataron los pellets en 100 µl de agua miliQ a 55°C. Todas las centrifugaciones se realizaron a 14 000 rpm. La concentración de las muestras se midió utilizando el equipo NanoDrop.

Genotipificación mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Para identificar los alelos silvestres y los alelos mutantes se realizaron ampliaciones de ADN por PCR, utilizando diferentes pares de oligonucleótidos en cada caso. Como ADN templado se utilizó ADN genómico de las plantas *ric* y *rip* de la generación M2 y M3, y se descartaron las muestras con concentración menor a 20 ng/µl, además se pusieron dos muestras adicionales como controles, ADN genómico de una planta silvestre como templado y una reacción sin ADN templado (H₂O). Por lo general, las reacciones de PCR constan de la repetición de las siguientes etapas: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento de oligonucleótidos durante 30 segundos, con temperatura variable de acuerdo con el par de oligonucleótidos que se utilicen y elongación a temperatura variable de acuerdo con la enzima que se utilice, generalmente 72°C y tiempo variable con respecto al tamaño del amplicón; además se añaden etapas de desnaturalización inicial y elongación final. Para amplificar el alelo silvestre, se utilizaron los oligonucleótidos Forward (F) y Reverse (R) específicos del gen estudiado (ver tabla 3) como se muestra en la ilustración 8. Si existe un producto de amplificación en esta PCR, significa que la muestra contiene por lo menos un alelo silvestre, la planta podría ser silvestre o heterocigota.

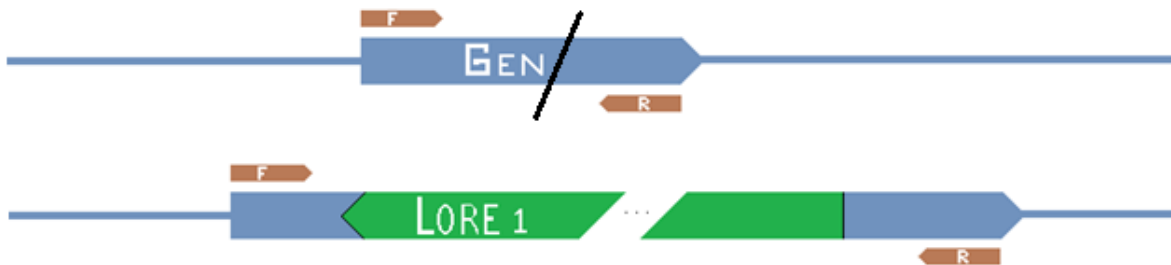


Ilustración 13. Esquema de hibridación de oligonucleótidos para identificación de alelos silvestres. (Ilustración de Jesús Daniel Castro)

Las secuencias de oligonucleótidos usados para cada línea y tamaños de amplicón se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de alelos silvestres.

Línea	Primer F	Primer R	Tamaño del amplicón
<i>ric1.1</i>	RIC 1.1 LORE1 F 5'-TGAAGCATTGGGGTCTCTTCGCTCA-3'	RIC 1.1 LORE1 R 5'-TCGTTTCTCATCTCACTGCACCCA-3'	572 pb
<i>rip3.1</i>	RIP 3.1 LORE1 F 5'-TGATTTTCGCTCAATGACTTTGGGGC-3'	RIP 3.1 LORE1 R 5'-GGTCCCTGGGATGGGTTGTTTGGT-3'	467 pb
<i>rip3.2</i>	RIP 3.2 LORE1 F2 5'-CCCTCGCGTTGCACCTCTGC-3'	RIP 3.2 LORE1 R2 5'-GGGAAAAACATAATCCCAACTGGCTCT-3'	230 pb
<i>rip5.1</i>	RIP 5.1 LORE1 F 5'-TGGAACCATGGTCTCTCTGCTTCTGC-3'	RIP 5.1 LORE1 R 5'-GCGTTCTCGGAAGCACGCTTCTCT-3'	601 pb
<i>rip5.2</i>	RIP 5.2 LORE1 F 5'-ATTTCCGGCTTCGGTGCATCTGGT-3'	RIP 5.2 LORE1 R 5'-GACCGGCGTTCGCCAAGAAGTACA-3'	467 pb
<i>rip7.1</i>	RIP .1 LORE1 F 5'-TCCCACCAATTCTCCAACCAACG-3'	RIP .1 LORE1 R 5'-TGTATGGGATCTGAATGATGGACGAACA-3'	698 pb
<i>rip7.2</i>	RIP 7.2 LORE1 F 5'-TCCCACCAATTCTCCAACCAACG-3'	RIP 7.2 LORE1 R 5'-TGTATGGGATCTGAATGATGGACGAACA-3'	698 pb
<i>rip.2</i> (<i>rip2.17</i>)	RIP.2 LORE1 F 5'-TCGCACGCTCCAGTTGTTCAAAGC-3'	RIP.2 LORE1 R 5'-TGCAGAGTCAGCAATGCCGAGAC-3'	515 pb

El programa de PCR que se siguió para las muestras fue el siguiente:

Tabla 4. Programa de PCR para identificar alelos silvestres.

Desnaturalización inicial (DI)	Desnaturalización (D)	Alineamiento (A)	Extensión (E)	Extensión final (EF)	
94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	10°C
3min	30s	40s	42s	2min	----
		35 ciclos		1 ciclo	

Para la identificación de los alelos con la inserción se utilizarán los oligonucleótidos Forward (F) y P2, el primero se encuentra en la secuencia del alelo silvestre, mientras que P2 está al inicio de la inserción, lo que nos permitirá reconocer los alelos que presentan la inserción en nuestro gen de interés (Ilustración 9). Al tener una amplificación podremos concluir que la muestra

presenta por lo menos un alelo mutante con la inserción, la planta podría ser homocigota mutante o heterocigota.

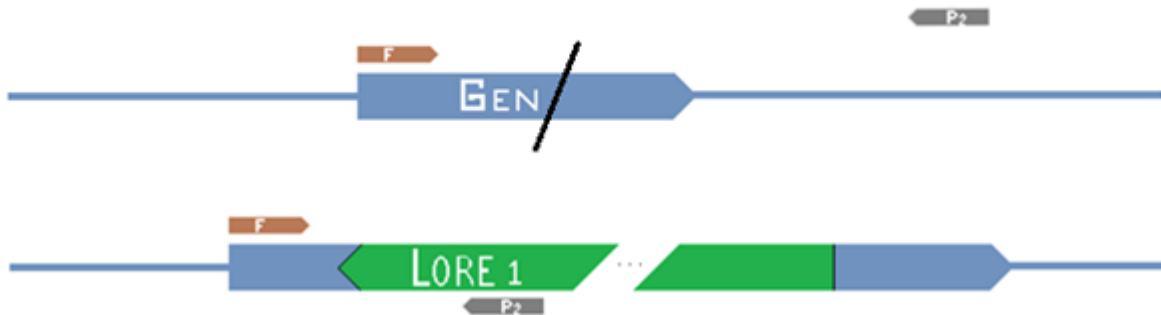


Ilustración 14. Esquema de hibridación de oligonucleótidos Forward y P2 para la identificación de alelos mutantes. (Ilustración de Jesús Daniel Castro.)

Las secuencias de oligonucleótidos usados para cada línea y tamaños de amplicón se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de alelos mutantes.

Línea	Primer F	Primer R	Tamaño del amplicón
<i>ric1.1</i>	RIC 1.1 LORE1 F3	P2 5'-CCATGGCGGTTCCGTGAATCTTAGG-3'	~513 pb
	RIC 1.1 LORE1 R2	P2 BIS R 5'-GTGCTGGTTCAGTGGCTAGGTGAAA-3'	<500
<i>rip3.1</i>	RIP 3.1 LORE1 F	P2	~393 pb
<i>rip3.2</i>	RIP 3.2 LORE1 F2	P2	~344 pb
<i>rip5.1</i>	RIP 5.1 LORE1 F	P2	~516 pb
<i>rip5.2</i>	RIP 5.2 LORE1 F	P2	~410 pb
<i>rip7.1</i>	RIP 7.1 LORE1 F	P2	~475 pb
<i>rip7.2</i>	RIP 7.2 LORE1 F	P2	~444 pb
<i>rip.2</i> (<i>rip2.17</i>)	RIP.2 LORE1 F	P2	~497 pb

En este caso, realizamos una “Touch Down – PCR” para identificar los alelos mutantes mediante el siguiente programa:

Tabla 6. Programa de “Touch Down-PCR” para identificar alelos mutantes.

DI	D	A y E	D	A	E	D	A	E	EF	
95°C	94°C	72°C	94°C	67°C	72°C	94°C	62°C	72°C	72°C	10°C
5min	30s	1:15min	30s	1min	45s	30s	1min	45s	2min	---
	5 ciclos			10 ciclos			22 ciclos		1 ciclo	

Los resultados de las PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, que nos permitió visualizar bandas de los fragmentos de ADN amplificados. Para confirmar el genotipo de las muestras que se analizaron, se observaron los resultados de ambas PCR como se muestra en la ilustración 10, si presentaron amplificación con ambas, nos indica que son heterocigotas, ya que cuentan con un alelo silvestre y un mutante; mientras que si sólo amplificaron en la segunda PCR (F+P2), confirmamos el genotipo homocigoto mutante, siguiendo la misma lógica, nuestro control silvestre solamente tendrá amplificación en la primera PCR (F+R).

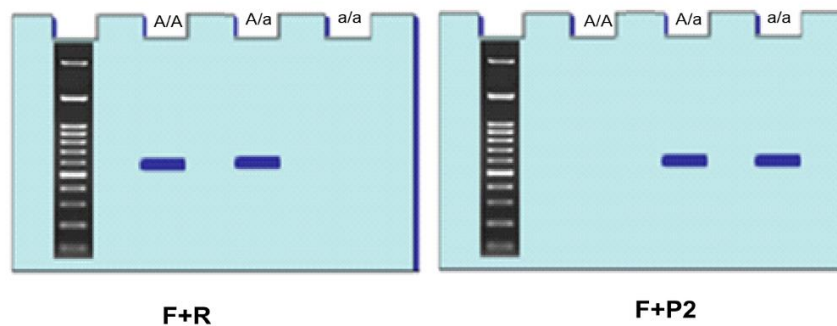


Ilustración 10. Ejemplo de confirmación de genotipo mediante la comparación de gels de electroforesis de productos de PCR para la identificación de alelos silvestres y mutantes. (Ilustración de Jesús Daniel Castro)

Elección de los candidatos *ric* y *rip* en *L. japonicus*.

Para elegir los candidatos *ric* y *rip* con los que se realizará la caracterización, se establecieron los siguientes criterios de selección: que existan dos líneas de inserción distintas para el mismo gen, que el gen se exprese en la raíz en respuesta a la interacción con *M. loti*, que las plantas no presenten defectos en la producción de semillas, que tengan parentales M2 con genotipo homocigoto mutante confirmado y que presenten un fenotipo distinto al silvestre a 28 DPI en la

relación de nódulos/cm de raíz principal. Con la finalidad de comprobar el último criterio se hizo un escrutinio fenotípico de las líneas mutantes *ric* y *rip* por retrotransposición LORE1 disponibles en el laboratorio que cumplieran con los primeros tres criterios de selección. Este escrutinio se realizó a 28 días posteriores a la inoculación (DPI) con las bacterias fijadoras de nitrógeno *M. loti* (D.O._{600nm} de 0.8), para buscar aquellas que presentaran un fenotipo distinto a la línea silvestre (Gifu) en la producción de nódulos derivada del proceso simbiótico, tomando en consideración la relación de nódulos/cm de raíz principal (véanse los siguientes apartados para la metodología detallada de fenotipificación). Durante el escrutinio, se realizaron tres experimentos independientes, en cada experimento se evaluaron dos líneas mutantes con respecto a Gifu, en el primero se evaluaron *rip5.1* y *rip3.2*, en el segundo se evaluaron *ric1.1* y *rip7.3* y finalmente se evaluaron *rip3.1* y *rip7.2*. Se tomaron en cuenta como candidatos, aquellos que cumplieran con la mayoría de los criterios de selección establecidos.

Fenotipificación.

Para poder detectar si la mutación de un gen *RIC* o *RIP* causa una diferencia de fenotipo comparado a las plantas silvestres en el contexto de la simbiosis, se realizaron análisis fenotípicos a 7 DPI y 28 DPI de los candidatos elegidos a partir del escrutinio a 28 DPI de plantas pertenecientes a la generación M3 de las líneas mutantes, cuyas semillas fueron obtenidas a partir de parentales homocigotos mutantes de la generación M2. Los detalles metodológicos para lograr los análisis fenotípicos, desde la germinación de semillas hasta concluir la fenotipificación, se describen a continuación.

Germinación de *L. japonicus* y aclimatación.

Se utilizaron aproximadamente 25 semillas de cada línea de *L. japonicus*, se escarificaron para mejorar la germinación con lija de agua N°220, posteriormente se esterilizaron mediante inmersión en la solución 1 (que contiene etanol al 75% y 0.1% de SDS). Luego se lavaron con H₂O estéril y se realizó una inmersión en solución 2 (que contiene cloro al 20% y 0.1% de SDS). Posteriormente se realizaron lavados con H₂O estéril hasta eliminar rastros de espuma. Para promover la imbibición de las semillas, se mantuvieron en agitación con H₂O estéril durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se eliminó el agua con la que se agitaron y se transfirieron a papel filtro estéril húmedo con H₂O estéril dentro de una caja Petri para mantenerlas hidratadas, este proceso se realizó en la campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Se colocaron un máximo de 25 semillas por cada caja Petri. Las semillas se incubaron en un cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 23-24°C por 5 días. Después de ese periodo se realizó el trasplante a macetas con vermiculita previamente esterilizada, humedecida homogéneamente con solución B&D con bajo contenido de nitrógeno. Las macetas fueron cubiertas con una bolsa plástica y se cultivaron durante 7 días más en las mismas condiciones, la bolsa plástica se retiró gradualmente para que las plantas se adaptaran a las nuevas condiciones de humedad. Se colocaron 5 plantas por maceta.

Inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno *M. loti*.

Después de 7 días de crecimiento y aclimatación en la vermiculita, cada planta fue inoculada con 1 ml de solución que contiene *M. loti LacZ* (véase sección “Material biológico” para detalles del cultivo de *M. loti LacZ* y de la preparación de inóculo), la solución se colocó en las raíces. De esta manera, mediante una tinción, logramos observar dónde se encontraban las bacterias una vez que fueron puestas en contacto con la planta. También nos facilitó la visualización de los hilos de infección y de los primordios de nódulos.

Cosecha de plantas.

Transcurrido el tiempo deseado después de la inoculación, las plantas se cosecharon con mucho cuidado de no romper las raíces. Cada maceta se sumergió en un recipiente con agua corriente y se giró suavemente para aflojar el sustrato de las raíces, una vez liberadas las raíces se les retiró el exceso de vermiculita y se colocaron en recipientes con agua de la llave para evitar la deshidratación de las plantas.

Tinción LacZ.

Para realizar la tinción, las raíces se sumergieron en solución de fijación (Glutaraldehído 1.25%, Buffer de fosfato de sodio 0.04M) dentro de cajas de 24 pozos, colocando 5 raíces por pozo, y se infiltraron durante 15 minutos en la cámara de vacío, luego se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró la solución de fijación y se añadió solución de tinción (Buffer de fosfato de sodio 0.086M, Ferricianuro de Potasio 5mM, Ferrocianuro de potasio 5mM, X-gal 0.08%), se infiltraron durante 15 minutos y después se dejaron incubando a 25°C en condiciones de oscuridad durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados con buffer de fosfato de sodio 0.1M pH 7.3 y dos lavados con agua destilada. Luego se incubó el tejido en la Solución I de la fase de aclaramiento (HCl 0.24N, Metanol 20%) durante 15 minutos a 55°C. Transcurrido el tiempo, se retiró esta solución y se añadió Solución II de la fase de aclaramiento (NaOH 7%, Etanol 60%), se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró la Solución II y se realizaron incubaciones secuenciales de etanol. Primero se incubó 5 minutos a temperatura ambiente en etanol 40%, luego en etanol 20% y después en etanol 10%. Finalmente se agregó Solución III (Etanol 5%, Glicerol 25%) y se infiltró durante 15 minutos en la cámara de vacío, se retiró esta solución y se agregó glicerol 50% para conservar las muestras. La preparación de las soluciones de fijación, tinción y aclaramiento se encuentran en el Anexo 1. En esta tinción se utiliza el compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil--D-galactopiranosido) como indicador de aquellas células que expresan la enzima β -galactosidasa, codificada por el gen *LacZ*, de manera que la β -galactosidasa corta a X-gal y forma un precipitado azul.

Fenotipificación a 7 DPI.

Siete días posteriores a la inoculación se cosecharon las plantas y se realizó tinción LacZ de las raíces. Debido a que las bacterias fijadoras de nitrógeno *M. loti* con las que fueron inoculadas las plantas expresan el gen reportero *LacZ*, mediante la tinción se facilitó la observación con el microscopio óptico en campo claro con el objetivo 20X para realizar el conteo de microcolonias, el conteo y la clasificación de hilos de infección (HI), diferenciando los que están en la epidermis, de los que llegaron al córtex y de los que presentaron defectos, así como el conteo de primordios de nódulos.

Fenotipificación a 28 DPI.

A los veintiocho días post-inoculación, se cosecharon con cuidado las plantas (véase “Cosecha de plantas”), se midió la longitud de la raíz principal, se contó el número total de nódulos y se clasificaron como maduros o no maduros, según su tamaño y su coloración (rosada o blanquecina, respectivamente) como se muestra en la figura 1. Se tomó el peso fresco de las raíces y el peso fresco de parte aérea de cada planta (tallo y hojas).

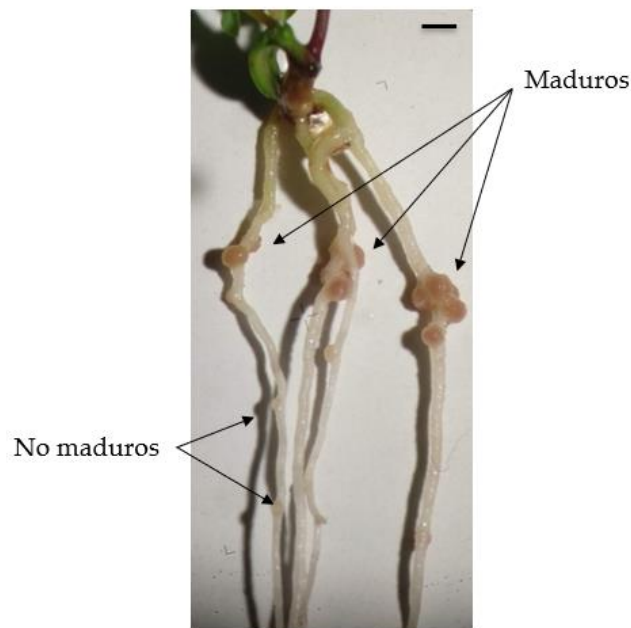


Figura 1. Clasificación de nódulos de acuerdo con su coloración. Nódulos maduros presentan coloración rosada y los nódulos no maduros presentan coloración blanquecina. Barra de escala = 2mm.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la fenotipificación a 7 DPI fueron normalizados por centímetro de raíz (la medición de las raíces se realizó después de la tinción y se realizó un análisis estadístico One Way ANOVA seguido de una prueba para comparaciones múltiples Dunnett con un valor $\alpha=0.05$ en el programa GraphPad Prism 9 para determinar si existen diferencias significativas entre las líneas mutantes con respecto a la silvestre (p value <0.05). El experimento se realizó por triplicado. A 28 DPI se calculó la relación de nódulos totales/cm de raíz y se realizó una prueba One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$ en el programa Graphpad Prism 9 para comparar esta relación entre cada línea mutante con respecto a la silvestre, que nos permitió aclarar si la diferencia entre ellas es estadísticamente significativa (p value <0.05). El experimento se realizó por triplicado.

Análisis filogenético.

Se hizo un análisis filogenético en el programa MEGAX, de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RIC y RIP identificadas en *L. japonicus* y en *A. thaliana* para observar el grado de conservación de estas proteínas y su agrupación, infiriendo que entre más cercanos sean los miembros de *L. japonicus* a los miembros de *A. thaliana* existe mayor probabilidad de que realicen las mismas funciones. El alineamiento se realizó con el algoritmo MUSCLE y el árbol filogenético con el algoritmo Maximum likelihood (Bootstrap 1000) (Felsenstein, 1985; Jones *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2018).

RESULTADOS

Genotipificación mediante amplificación por PCR.

Antes de elegir los candidatos *ric* y *rip* para realizar la caracterización, se realizó la confirmación del genotipo de las plantas madre (generación M2) mediante PCR. Esta confirmación es necesaria dado que, las semillas recibidas de la generación M2 fueron una población heterogénea entre homocigotas silvestres, heterocigotos y homocigotas mutantes. A pesar de que anteriormente se realizó la genotipificación de estas plantas y solamente se eligieron las homocigotas mutantes para producción de semillas (Mejía-Martínez, 2019) dado que tenemos que asegurarnos de que realmente tenemos sólo homocigotas mutantes. En el laboratorio del Dr. Alexandre Tromas contamos con dos líneas de inserción para RIC y 8 líneas de inserción para algunos genes RIP, que se muestran en la tabla 7; de estas líneas de inserción se cuenta con plantas de la generación M2 produciendo semillas M3.

Tabla 7. Líneas de inserción *rip* y *ric* en *L. japonicus*.

Gen	Línea	ID Línea de inserción
<i>RIC1</i>	<i>ric1.1</i>	30071758
Lj1g3v0052540	<i>ric1.2</i>	30020272
<i>RIP1</i>	<i>rip1.1</i>	30075347
Lj0g3v0024499		
<i>RIP3</i>	<i>rip3.1</i>	30017535
Lj0g3v0317209	<i>rip3.2</i>	30133716
<i>RIP5</i>	<i>rip5.1</i>	30066777
Lj3g3v1015390	<i>rip5.2</i>	30065648
<i>RIP7</i>	<i>rip7.1</i>	30013177
Lj5g3v0616420	<i>rip7.2</i>	30102546
	<i>rip7.3 (2.17)</i>	30007123

Se extrajo ADN genómico a partir de hojas de las plantas y posteriormente se realizaron dos PCR, como se describió en la metodología, uno con oligonucleótidos específicos de cada gen (Fw y Rv) y otro con un oligo específico del gen y otro específico de la inserción denominado P2. Como se esperaba, para las plantas homocigotas mutantes, solamente hubo amplificación con el PCR para identificar alelos mutantes (F+P2), y las plantas de genotipo WT tuvieron amplificación solamente en el PCR con los oligos para el alelo silvestre (F+R), un ejemplo de este resultado se muestra en la figura 2.

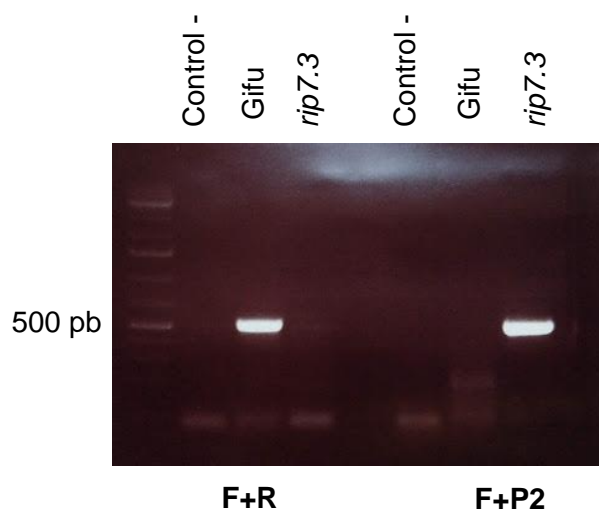


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para genotipificación de *rip7.3*. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular Gene ruler 1kb+, en el segundo carril se encuentra el control - (H_2O) para la reacción de identificación de alelos silvestres, en el tercer carril se encuentra la muestra Gifu (WT) y en el carril 4 la muestra *rip7.3*, el tamaño esperado de amplicón es de 515pb. Se dejó un carril vacío y en los siguientes se encuentran en el mismo orden las muestras para la identificación de alelos mutantes con un tamaño esperado de amplicón de 497 pb.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de la genotipificación, en la mayoría de las plantas de las líneas mutantes, se confirmó el genotipo homocigoto mutante para el gen de interés.

Tabla 8. Resultados de genotipificación de plantas mutantes ric y rip.

Línea	Muestra (Planta)	Amplificación		Genotipo
		WT (F+R)	Mutante (F+P2)	
WT	Gifu	Si	No	Homocigota silvestre
	<i>ric1.1_1</i>	No	Si	Homocigota mutante
<i>ric1.1</i>	<i>ric1.1_2</i>	No	Si	Homocigota mutante
	<i>ric1.1_3</i>	No	Si	Homocigota mutante
<i>rip3.1</i>	<i>rip3.1</i>	**	Si	**
<i>rip3.2</i>	<i>rip3.2</i>	No	Si	Homocigota mutante
	<i>rip5.1_1</i>	No	Si	Homocigota mutante
<i>rip5.1</i>	<i>rip5.1_2</i>	No	Si	Homocigota mutante

<i>rip5.2</i>	<i>rip5.2 M2</i>	No	Si	Homocigota mutante
	<i>rip5.2 *</i>	No	Si	Homocigota mutante
<i>rip7.1</i>	<i>rip7.1</i>	No	Si	Homocigota mutante
<i>rip7.2</i>	<i>rip7.2</i>	No	Si	Homocigota mutante
<i>rip7.3</i>	<i>rip2.17→7.3</i>	No	Si	Homocigota mutante

**El control positivo (Gifu) tampoco amplifica.

El genotipo de la planta *rip3.1* aún no está muy claro, a pesar de que se identifica el alelo mutante, en la identificación de los alelos silvestres, nuestro control positivo (Gifu) no amplificó. Para descartar que sea un problema con la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, se realizó un PCR con gradiente de temperatura (55°C-58°C-60°C-62°C-65°C-68°C) utilizando ADN_g de Gifu (WT) para ver si se encontraba alguna temperatura óptima para la amplificación de este fragmento. Sin embargo, no obtuvimos amplificación con ninguna de las temperaturas, esto podría apuntar a algún error con el oligo Rv que no permite la amplificación, dado que en la identificación del alelo mutante se usa el mismo oligo Fw que en la identificación de alelo silvestre y sí se logra una amplificación del tamaño esperado. El genotipo homocigoto mutante en la generación M3 se confirmó en las líneas elegidas para realizar la caracterización, evaluando como mínimo 8 plantas de cada línea.

Elección de los candidatos *ric* y *rip* en *L. japonicus*.

Con excepción del gen *RIP1*, se tienen dos líneas de inserción de cada uno de los genes RIC y RIP, entonces, para elegir de manera más acertada los candidatos correspondientes, se realizó el escrutinio de las líneas cosechadas a 28 DPI con *M. loti LacZ*. Se midió la longitud de la raíz principal, se obtuvo el peso fresco de las raíces, se realizó el conteo y la clasificación de nódulos para cada planta, siguiendo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. En la figura 3 se muestran las gráficas de los resultados obtenidos de la medición de longitud de raíz principal de las líneas mutantes con respecto a plantas silvestres del ecotipo Gifu, en los que no se observan diferencias entre las líneas mutantes con respecto a Gifu, excepto en la línea *ric1.1* en la que la longitud de la raíz principal es significativamente menor (p value=0.026).

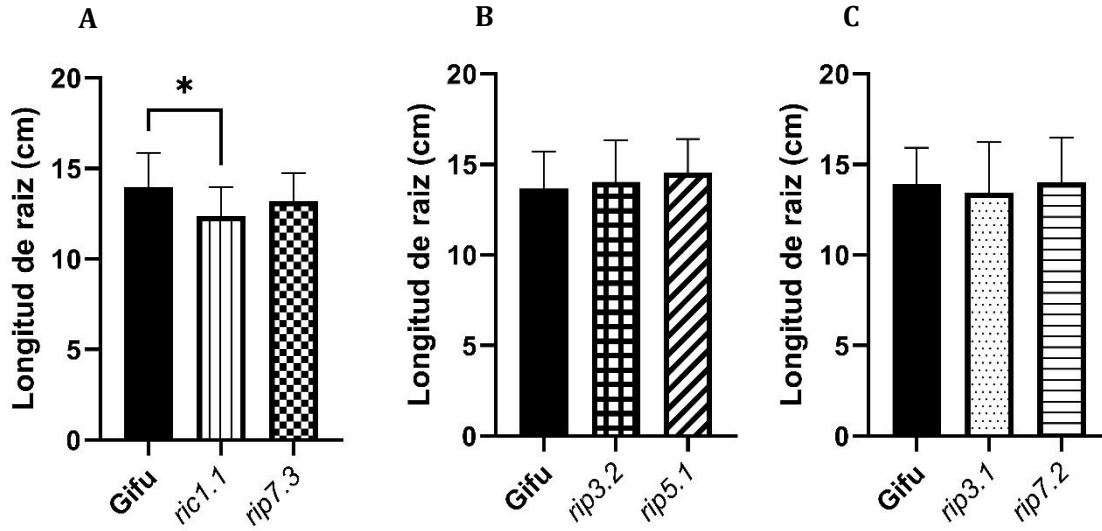


Figura 3. A-C) Longitud de raíz de plantas Gifu, *ric1.1* y *rip7.3*, *rip3.2* y *rip5.1*, *rip3.1* y *rip7.2* a 28 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el *p* value obtenido es <0.05 , donde (*)0.033. Cada muestra está representada por $n=15$.

En cuanto al peso fresco de las raíces, los resultados obtenidos muestran que las líneas *ric1.1* y *rip7.2* presentaron una disminución estadísticamente significativa con respecto a las raíces del ecotipo Gifu (Figura 4).

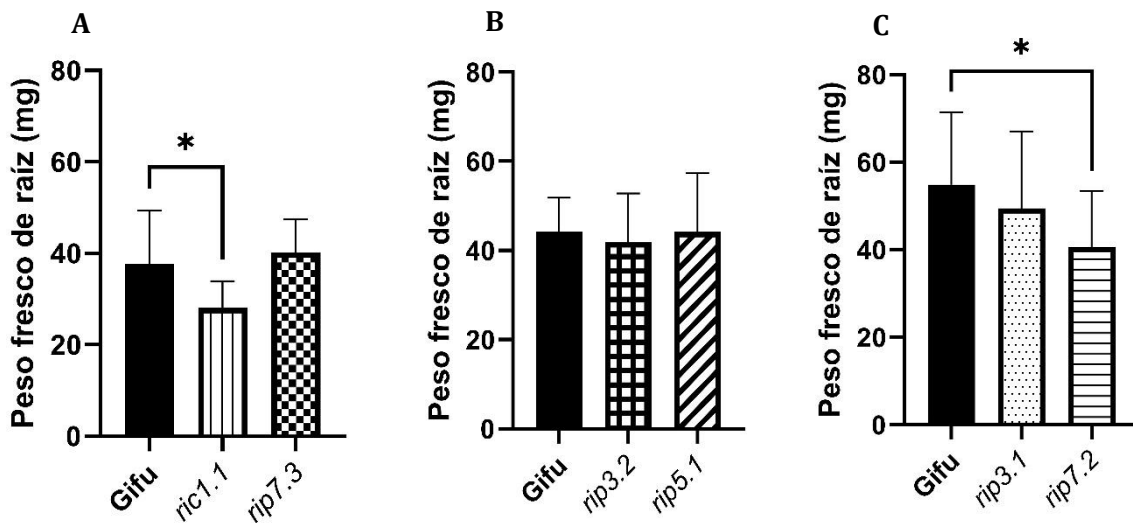


Figura 4. A-C) Peso fresco de raíz de plantas Gifu, *ric1.1* y *rip7.3*, *rip3.2* y *rip5.1*, *rip3.1* y *rip7.2* a 28 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el *p* value obtenido es <0.05 , donde (*)0.033. Cada muestra está representada por $n=15$.

Finalmente, en la figura 5 se muestran las gráficas de los resultados de la relación entre nódulos por centímetro de raíz. La línea *ric1.1* presentó una disminución en la relación de número de nódulos/cm de raíz con respecto a Gifu, sin embargo, el *p* value obtenido tras realizar el análisis estadístico es mayor que 0.05, lo que indica que la diferencia no es estadísticamente significativa. Por otro lado, la línea *rip5.1* si presentó una disminución significativa con respecto a Gifu (*p* value =0.009). El resto de las líneas evaluadas, afectadas en los genes *RIP3* y *RIP7*, no presentaron diferencias con respecto al ecotipo Gifu. En el anexo 2 se encuentra la gráfica de barras apiladas para el conteo de nódulos.

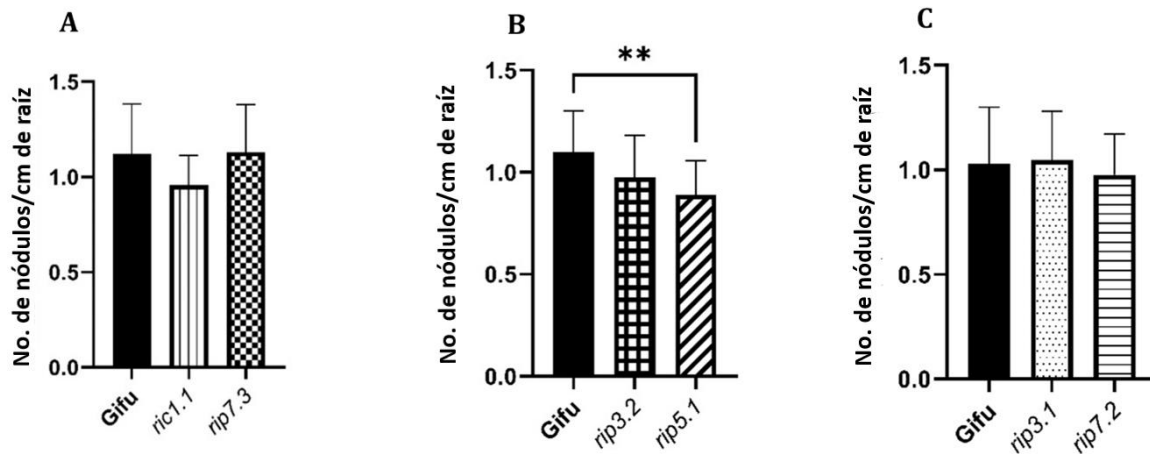


Figura 5. Nódulos/cm raíz de plantas Gifu, *ric1.1* y *rip7.3*, *rip3.2* y *rip5.1*, *rip3.1* y *rip7.2* a 28 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el *p* value obtenido es <0.05 , donde (*)0.033, (**) 0.002 y (***) <0.001 . Cada muestra está representada por $n=15$.

Este primer escrutinio, nos permitió aclarar la elección de los candidatos con los que proseguirá la caracterización, en la tabla 9 se muestran los candidatos y los criterios de selección con los que cumple cada uno. De los candidatos evaluados, se eligieron las líneas pertenecientes a los genes *RIC1*, *RIP5* y *RIP7* dado que, cumplían con la mayoría de los criterios de selección.

Tabla 9. Resumen de cumplimiento de criterios de selección por los candidatos RIC y RIP.

Gen	Criterios de selección				
	Expresión (Kelly <i>et al.</i> , 2018)	Líneas LORE1	Producción de semillas	Parentales M2 Homocigotos mutantes.	Fenotipo distinto a Gifu a 28 DPI (Nódulos/cm de raíz)
RIC1	Pelo radical y raíz.	<i>ric1.1</i>	Si	Si	No
		<i>ric1.2</i>	Insuficiente	----	----
RIP3	NO	<i>rip3.1</i>	Si	----	No
		<i>rip3.2</i>	Si	Si	No
RIP5	Raiz y primordio de nódulo.	<i>rip5.1</i>	Si	Si	Si
		<i>rip5.2</i>	Insuficiente	Si	----
RIP7	Raiz y primordio de nódulo.	<i>rip7.2</i>	Si	Si	No
		<i>rip7.3</i>	Si	Si	No

Para contender con la escasez de semillas, se realizaron esquejes de *rip5.2* y se sembraron plantas *ric1.2*. Desafortunadamente para el desarrollo de este proyecto no se obtuvieron semillas suficientes de la generación M3 a tiempo.

Caracterización de mutantes *ric* y *rip* durante el proceso de simbiosis fijadora de nitrógeno.

Para poder detectar si la mutación de un gen *RIC* o *RIP* causa una diferencia de fenotipo comparado a las plantas silvestres en el contexto de la simbiosis, se realizó una caracterización a través de análisis fenotípicos a 7 DPI y 28 DPI de las líneas *ric1.1* y *rip5.1* elegidas a partir del escrutinio a 28 DPI, estos análisis se realizaron en plantas pertenecientes a la generación M3, cuyas semillas fueron obtenidas a partir de parentales homocigotos mutantes de la generación M2. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada tiempo analizado.

Fenotipificación a 7 días post-inoculación de candidatos *ric* y *rip*.

Se seleccionaron las líneas *rip5.1*, *ric1.1* y *rip7.3* para realizar el análisis de fenotipo a 7 DPI, dado que fueron las líneas que cumplieron con la mayoría de los criterios de selección y además se contaban con semillas M3 suficientes. Los datos obtenidos para la longitud de raíz de cada línea muestran que las líneas *rip7.3* y *ric1.1* a 7 DPI presentaron una disminución con respecto al ecotipo Gifu, siendo más significativa en la línea *ric1.1*. Mientras que la línea *rip5.1* no mostró una diferencia significativa con respecto a Gifu (Figura 6).

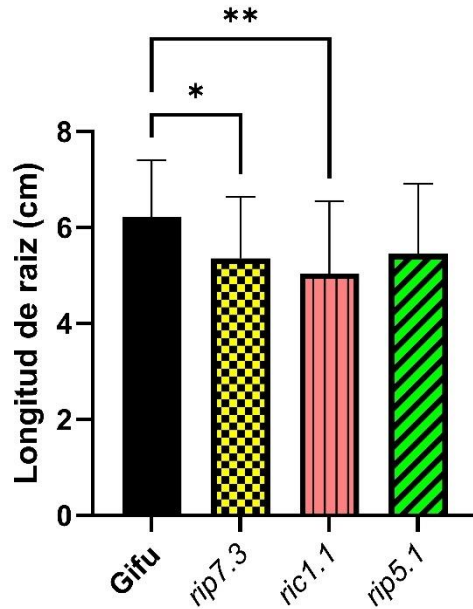


Figura 6. Longitud de raíz de plantas Gifu, ric 1.1, rip 5.1 y rip7.3 a 7 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 , donde (*)0.033 y (**) 0.002. Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=10$.

Los resultados del conteo de microcolonias, muestran que en la relación de microcolonias/cm de raíz (Figura 7) no hay diferencias estadísticamente significativas entre las líneas mutantes *rip7.3*, *ric1.1* y *rip5.1* con respecto al ecotipo Gifu.

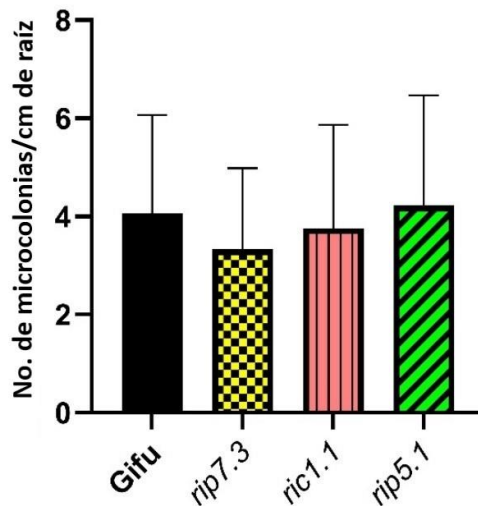


Figura 7. No. de microcolonias/cm de raíz de plantas Gifu, ric1.1, rip 5.1 y rip7.3 a 7 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de

comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=10$.

En la relación de hilos de infección totales (suma de HI en células epidermales, corticales y defectuosos) por cm de raíz (Figura 8), encontramos un aumento significativo de la línea *rip5.1* con respecto a Gifu. Mientras que en las líneas *ric1.1* y *rip2.17* no se observaron diferencias significativas. En el anexo 5 encontramos la gráfica de barras apiladas para el conteo de los hilos de infección.

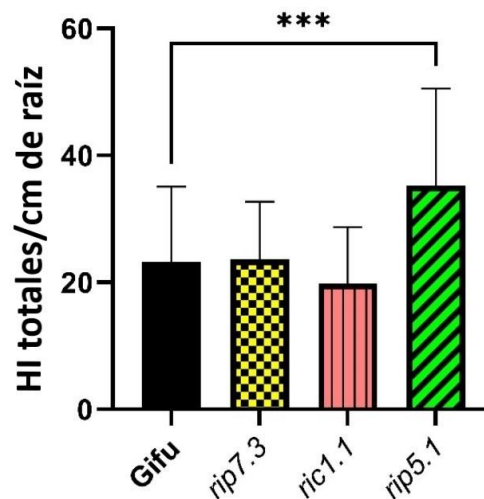


Figura 8. Hilos de infección totales/cm de raíz de plantas Gifu, *ric1.1*, *rip5.1* y *rip7.3* a 7 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 , donde (***) <0.001 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=10$.

Los hilos de infección se clasificaron en tres grupos: epidermales, corticales y defectuosos, podemos observar ejemplos en la figura 9.

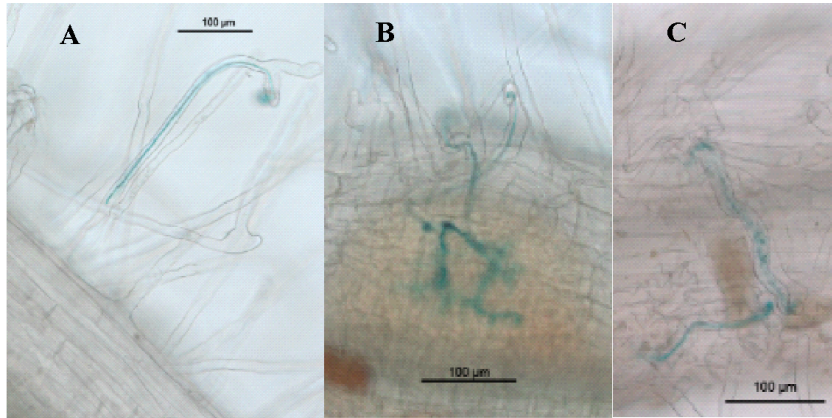


Figura 9. Clasificación de hilos de infección. A) Ejemplo de HI epidermal. B) Ejemplo de HI corticales. C) Ejemplo de Hilos de infección con defecto. Imágenes tomadas mediante microscopía óptica en campo claro, objetivo 20X.

En el caso de HI epidermales (Figura 10), en las líneas *rip7.3* y *ric1.1* no hubo diferencia con respecto al ecotipo Gifu. Mientras que en la línea *rip5.1* se observó un aumento significativo de hilos de infección epidermales/cm de raíz con respecto al ecotipo Gifu.

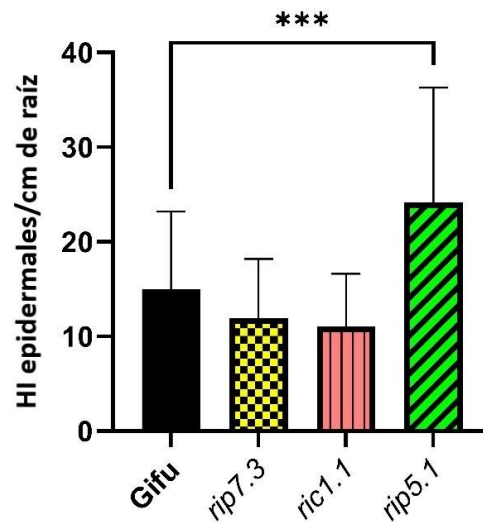


Figura 10. Hilos de infección epidermales/cm de raíz de plantas Gifu, *ric1.1*, *rip5.1* y *rip7.3* a 7DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 , donde (***) <0.001 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=10$.

En el caso de la relación de hilos de infección corticales/cm de raíz, no se encontraron diferencias significativas en ninguna línea mutante con respecto a Gifu (Figura 11).

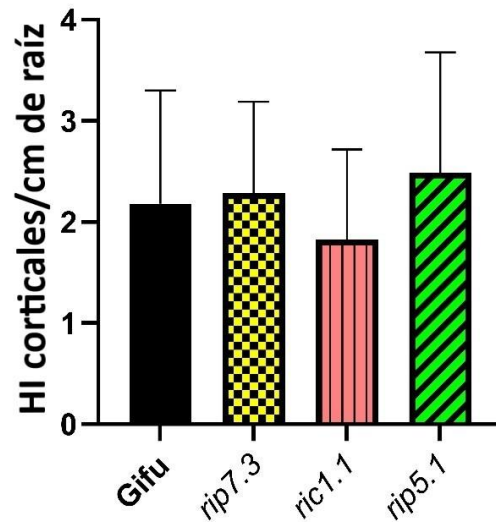


Figura 11. Hilos de Infección corticales/cm de raíz de plantas Gifu, ric1.1, rip 5.1 y rip7.3 a 7DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=10$.

Los resultados obtenidos para la relación de hilos de infección defectuosos/cm de raíz que están representados en la gráfica de la figura 12. Se observó una tendencia al aumento en las líneas evaluadas, siendo *rip5.1* en la que se observó mayor aumento en el promedio con respecto a Gifu, sin embargo, ninguna de las líneas presentó una diferencia estadísticamente significativa.

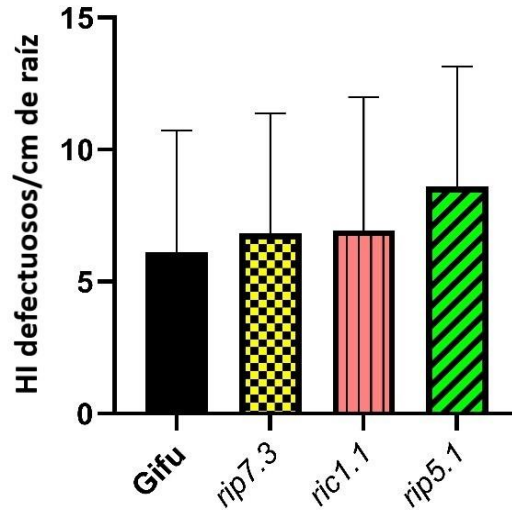


Figura 12. Hilos de Infección defectuosos/cm de raíz de plantas Gifu, ric1.1, rip 5.1 y rip7.3 a 7DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=10$.

Finalmente, los datos obtenidos del conteo de primordios de nódulos normalizados por cm de raíz que se presentan en la figura 13, nos muestran que no existen diferencias significativas entre las líneas mutantes evaluadas con respecto a Gifu.

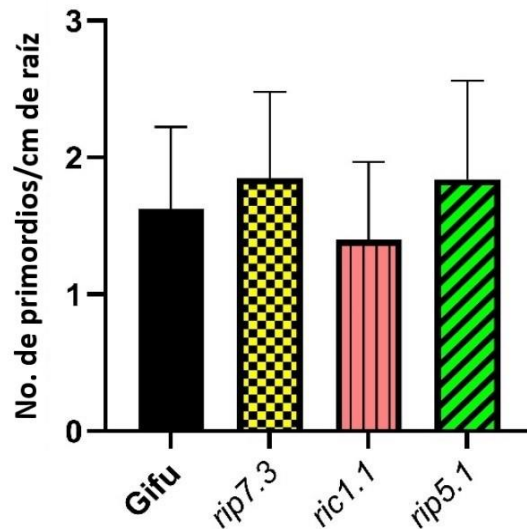


Figura 13. Número de primordios de nódulos/cm de raíz de plantas Gifu, ric 1.1, rip 5.1 y rip7.3 a 7 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=10$.

Fenotipificación a 28 días post-inoculación de candidatos *ric* y *rip*.

A 28 días post-inoculación (DPI), el análisis fenotípico realizado para verificar si la mutación de los genes *RIC1* y *RIP5* tienen como consecuencia la afectación de la formación de nódulos a través del proceso simbiótico entre *L. japonicus* y *M. loti*, se tomaron en cuenta la longitud de la raíz principal y el número de nódulos por cm de raíz de las plantas evaluadas, así como la clasificación de los nódulos que se contaron. Los resultados de la longitud de raíz principal de las líneas mutantes evaluadas (*rip7.3*, *ric1.1* y *rip5.1*) que se presentan en la figura 14 no mostraron diferencias significativas con respecto a Gifu, es decir, las plantas pertenecientes a las líneas mutantes no presentaron una afectación en el crecimiento de la raíz.

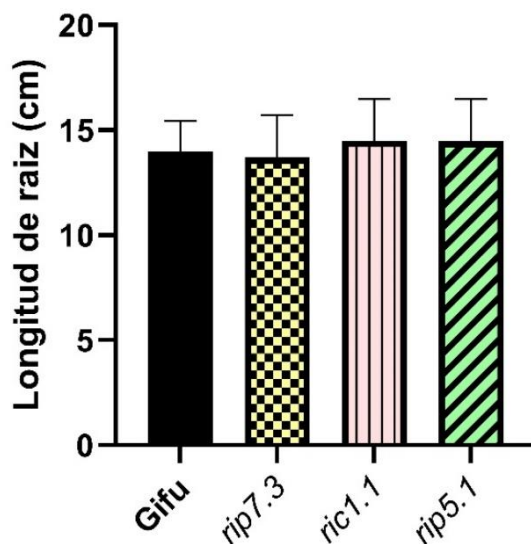


Figura 14. Longitud de raíz de plantas Gifu, *ric 1.1*, *rip 5.1* y *rip7.3* a 28 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=15$.

En cuanto al conteo de nódulos totales (no maduros + maduros) por planta, los datos muestran una disminución estadísticamente significativa en el promedio de las líneas *rip7.3*, *ric1.1* y *rip5.1* con respecto al ecotipo Gifu, siendo las diferencias de *ric1.1* y *rip5.1* con respecto a Gifu mayores que la diferencia entre *rip7.3* y Gifu (Figura 15). En el anexo 6 se encuentra la gráfica de barras apiladas del conteo de nódulos maduros y no maduros por planta.

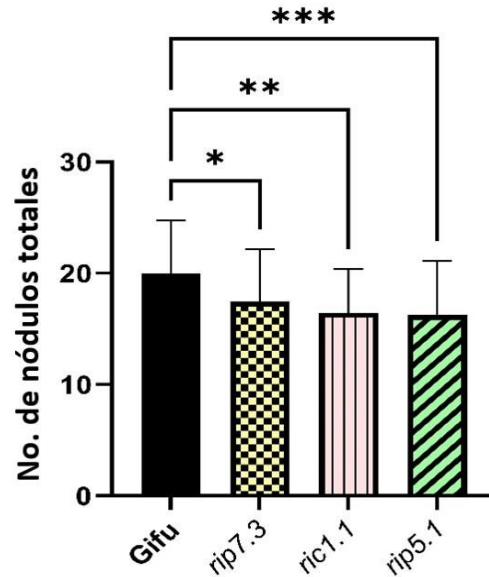


Figura 15. Número de nódulos totales de plantas Gifu, *ric 1.1*, *rip 5.1* y *rip7.3* a 28 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 , donde (*) 0.033 , (**) 0.002 y (***) <0.001 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=15$.

Para discernir si la disminución en el número total de nódulos está dada por los nódulos no maduros o maduros por planta, se graficaron por separado y se realizaron las pruebas estadísticas (Figura 16). Encontrando que para el conteo de nódulos no maduros por planta no hubo diferencia significativa con respecto al ecotipo Gifu de ninguna línea mutante (Figura 16A). En la gráfica de nódulos maduros por planta, observamos que únicamente *ric1.1* y *rip5.1* presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al ecotipo Gifu (Figura 16 B).

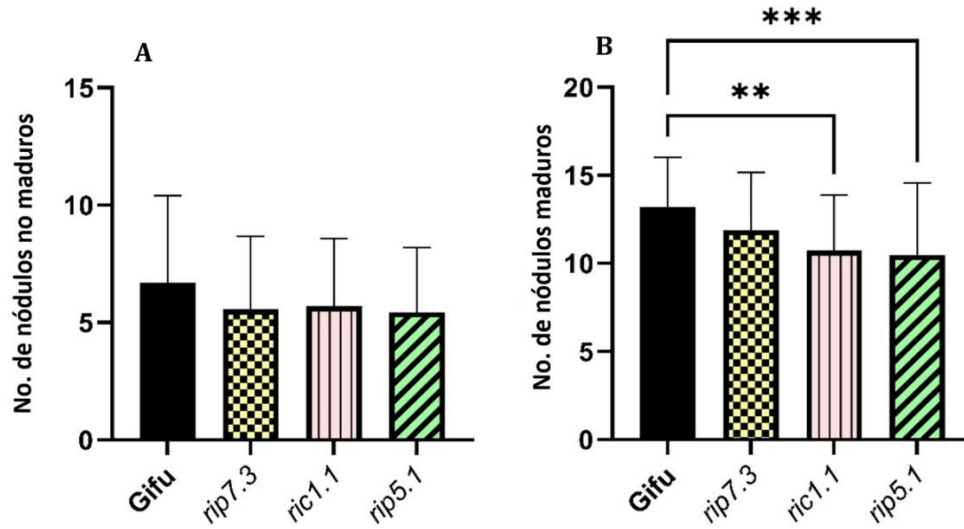


Figura 16. Gráficas de clasificación de nódulos de plantas Gifu, *ric1.1*, *rip5.1* y *rip7.3* a 28 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 , donde (**) 0.002 y (***) <0.001 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=15$.

Finalmente, al obtener la relación de número de nódulos totales/cm de raíz principal, se encontró que únicamente las líneas *ric1.1* y *rip5.1* presentaron una disminución estadísticamente significativa con respecto a Gifu (Figura 17).

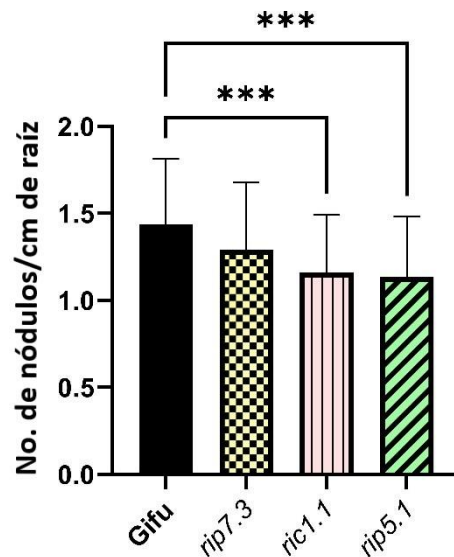


Figura 17. Número de nódulos totales/cm de raíz de plantas Gifu, *ric1.1*, *rip5.1* y *rip7.3* a 28 DPI. Todos los datos se presentan como promedio + desviación estándar, se realizó la prueba estadística One Way ANOVA, seguida de la prueba

de comparaciones múltiples Dunnett con $\alpha=0.05$. Se considera que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el p value obtenido es <0.05 , donde (***) <0.001 . Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con $n=15$.

Análisis filogenético.

Se realizó el análisis filogenético de las proteínas RIC y RIP de *L. japonicus* y *A. thaliana* a partir de las secuencias de aminoácidos en el programa MEGAX para observar el grado de conservación entre estas proteínas y su agrupación. Obtuvimos un árbol filogenético para cada grupo de proteínas. En el árbol filogenético de proteínas RIC, encontramos que se organizan en tres grupos principalmente, uno de los grupos está conformado únicamente por proteínas de *A. thaliana*, mientras que LjRIC1 Y LjRIC4 se agrupan con AtRIC9, AtRIC10 y AtRIC11, y el resto de las proteínas RIC de *L. japonicus* se agrupan con AtRIC4, AtRIC2 y AtRIC7 (Figura 18).

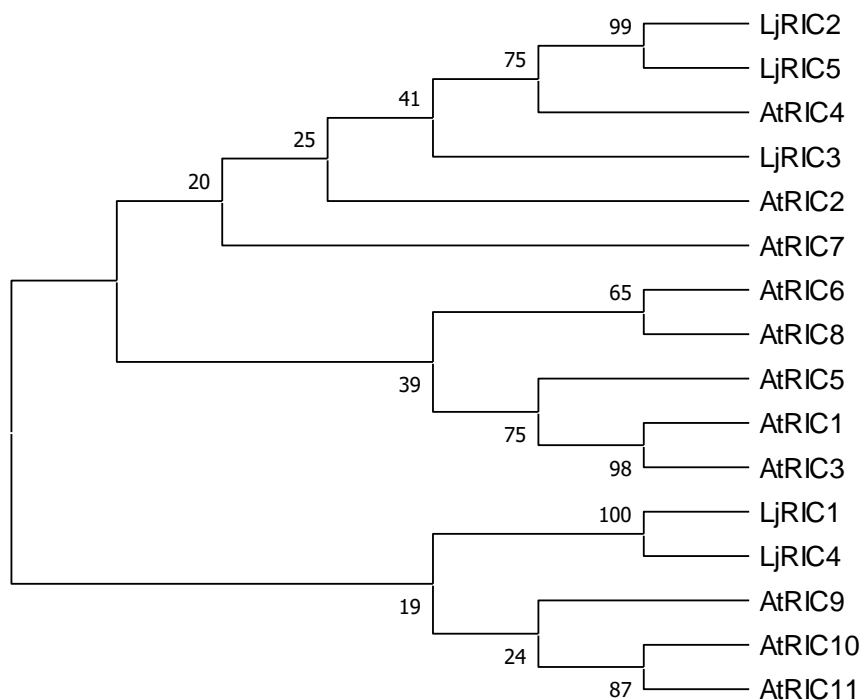


Figura 18. Árbol filogenético de proteínas RIC de *L. japonicus* y *A. thaliana*. El árbol filogenético se generó en el programa MEGAX a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RIC mediante el algoritmo Maximun Likelihood con un bootstrap de 1000.

En el árbol obtenido para las proteínas RIP, observamos que se forman tres grupos principales, pero en este caso uno de los grupos contiene únicamente dos proteínas de *L. japonicus* (RIP1 y RIP7), otro grupo contiene en su mayoría proteínas de *L. japonicus* y solamente una de *A.*

thaliana (RIP5), mientras que el grupo restante contiene en su mayoría proteínas de *A. thaliana* y una sola de *L. japonicus* (LjRIP5) que permanece muy cercana a AtRIP1 y AtRIP2 (Figura 19).

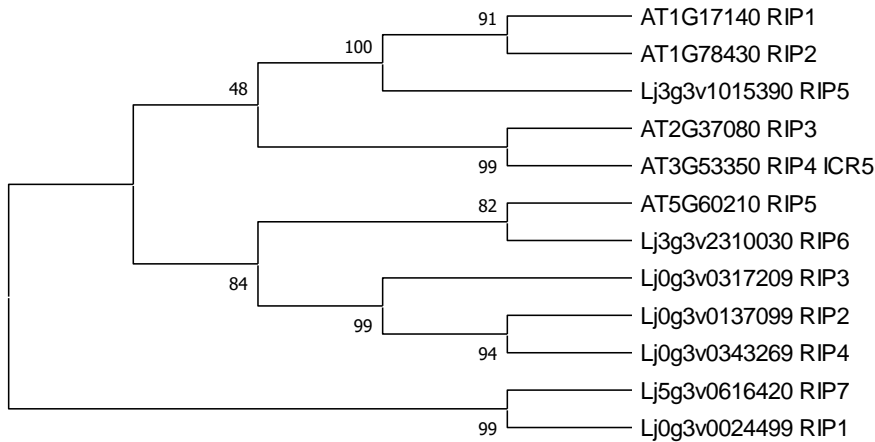


Figura 19. Árbol filogenético de proteínas RIP de *L. japonicus* y *A. thaliana*. El árbol filogenético se generó en el programa MEGAX a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RIP mediante el algoritmo Maximun Likelihood con un bootstrap de 1000.

DISCUSIÓN

Elección de candidatos *ric* y *rip*.

Para poder realizar la caracterización de un representante de la familia *RIC*, se eligió a *RIC1*, debido a que es el único candidato de esta familia que estaba disponible en el laboratorio, existen dos líneas mutantes y el gen está expresado en pelo radical de acuerdo con los datos de RNAseq de Kelly *et al.*, 2018 presentados en el anexo 3; aún con las desventajas en la escasez de semillas para una de las líneas, y que la disminución en la relación de nódulos/cm de raíz durante el escrutinio no fue significativa con respecto a Gifu.

En el caso de la elección del candidato para la familia *RIP*, se descartó a *RIP3* que no cumplió con la mayoría de los requisitos (Tabla 9). Únicamente se confirmó el genotipo homocigoto mutante en una de las líneas en la generación M2, no se encontró expresión en la raíz en la base de datos de *L. japonicus* (Anexo 4). Esto sugiere que no está involucrado durante el proceso de establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *L. japonicus* y *M. loti*, lo cual se confirmó en el escrutinio a 28 DPI dado que ninguna de las dos líneas evaluadas presentó diferencias en la relación de nódulos/cm de raíz con respecto a Gifu.

Se eligió a *RIP5* como representante de la familia *RIP* para realizar la caracterización fenotípica debido a que cumple con la mayoría de los criterios de selección. Existen dos líneas mutantes para este gen en las que se confirmó el genotipo homocigoto mutante para los parentales M2, se encontró expresión en la raíz y en primordios de nódulos de acuerdo con los datos de RNAseq de Kelly *et al.*, 2018 disponibles en la herramienta “Expression Atlas” de la base de datos de *L. japonicus* (Anexo 4). En el escrutinio a 28 DPI, *rip5.1* tuvo una disminución significativa en la relación de nódulos/cm de raíz con respecto a Gifu, desafortunadamente no se pudo evaluar *rip5.2* debido a la escasez de semillas M3 derivada de un defecto en la producción de semillas de esta línea.

También se eligió a *RIP7* que cumple con la mayoría de los criterios de selección, a pesar de no encontrar un fenotipo distinto en el escrutinio a 28 DPI, de acuerdo con los datos de RNAseq de Kelly *et al.*, 2018 (Anexo 4) se encontró expresión en la raíz y en primordios de nódulos y existen en nuestro laboratorio al menos dos líneas mutantes para este gen, con parentales M2 homocigotos mutantes confirmados.

Caracterización de mutantes *ric* y *rip* en el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

En este proyecto se realizó la fenotipificación de mutantes *RIC* y *RIP* en un ambiente deficiente en nitrógeno e inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno *M. loti* bajo la hipótesis de que en *L. japonicus* las proteínas efectoras *RIC1*, *RIP3*, *RIP5* y *RIP7* participan en la simbiosis fijadora de nitrógeno con *M. loti*. Se analizaron plantas de varias líneas mutantes de las dos familias génicas a 7 DPI con el objetivo de encontrar diferencias durante las etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis y a 28 DPI para evaluar si existe una afectación una vez que el proceso está completamente establecido inoculando con la cepa silvestre. Las tres líneas mutantes de *L. japonicus* con las que se hizo la fenotipificación (*ric1.1*, *rip5.1* y *rip7.3*) fueron capaces de desarrollar una simbiosis con *M. loti*. Sin embargo, *rip5.1* y *ric1.1* presentaron algunas diferencias con respecto a Gifu (WT) en los tiempos post-inoculación evaluados, sugiriendo que las proteínas a las que estos genes codifican podrían estar participando en el establecimiento de la simbiosis.

Infeción rizobial y desarrollo del hilo de infección

Es bien conocido que para que la SFN pueda llevarse a cabo, los primeros pasos de su establecimiento constan de un diálogo molecular entre los pelos radicales de la leguminosa y sus rizobios compatibles, que posteriormente permite el reconocimiento y la entrada de los rizobios desde las microcolonias a través de estructuras conocidas como hilos de infección que son dirigidos hasta las células del córtex en división donde se formarán los nódulos (Roy *et al.*, 2020). Durante esta primer etapa, el reacomodo del citoesqueleto es crucial para la reorientación del crecimiento polar del pelo radical, así como para la formación y el desarrollo del hilo de

infección, por ejemplo, en mutantes de componentes del complejo SCAR/WAVE como son *LjNap1*, *LjPir1* y *Ljscarn*, se forman pocos hilos de infección y además la mayoría se abortan de manera prematura y liberan las bacterias dentro del pelo radicular (Roy et al., 2020). Es interesante que, durante etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno, donde el reacomodo del citoesqueleto es esencial para que el proceso tenga éxito, la mutante *ric1.1* de *L. japonicus* no presente un fenotipo distinto al de la línea silvestre. Dado que las proteínas de la familia RIC se han descrito en *A. thaliana* participando en el reacomodo de componentes del citoesqueleto en el crecimiento polar del tubo polínico y la interdigitación de las células de las hojas (Feiguelman et al., 2018). Es probable que no se observe una diferencia en *ric1.1* debido a que RIC1 en *L. japonicus* no tenga una participación durante etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis. Otra posibilidad es que como en el reacomodo del citoesqueleto varias RIC actúan conjuntamente (Feiguelman et al., 2018), al tener mutación en una sola, no se obtiene un fenotipo distinto o que la ausencia de un fenotipo distinto sea consecuencia de que los miembros de la familia RIC presenten redundancia funcional, es decir, que otro miembro de la misma familia pueda tener la misma actividad que el miembro ausente. Esta última especulación tiene mayor sentido si observamos el árbol filogenético obtenido para las proteínas RIC (Figura 18), dado que los miembros RIC1 y RIC4 de *L. japonicus* se encuentran emparejados, además el patrón de expresión que presentan los genes que codifican a estas proteínas de acuerdo con los datos de Kelly et al., 2018 es muy parecido (Anexo 3), esto podría sugerir que en la mutante *ric1.1* la proteína RIC4 está realizando la función de RIC1. Sin embargo, estas especulaciones aún requieren ser probadas.

Por otro lado, los datos obtenidos muestran que *rip5.1* tiene mayor número de hilos de infección totales/cm de raíz con respecto a la silvestre (Figura 8). Cuando se observa la clasificación de hilos de infección, encontramos un aumento significativo en los hilos de infección que llegan hasta las células de la epidermis (Figura 10), también se observa un aumento en los hilos de infección que presentan defectos (Figura 12), aunque este aumento no es significativo, contribuye al aumento en los hilos de infección totales/cm de raíz. Estos resultados sugieren que RIP5 es importante para regular la entrada de bacterias a los pelos radicales, ya que su ausencia promueve un exceso de hilos de infección con respecto al ecotipo Gifu, sin embargo, no parece tener un papel importante en la colonización de las células del córtex debido a que no se encontraron diferencias en el número de hilos de infección corticales/cm de raíz con respecto a la silvestre a 7 DPI (Figura 11). Interesantemente, en el análisis filogenético LjRIP5 se encuentra en el mismo grupo que AtRIP1 (Figura 19), la proteína que se encuentra relacionada con la regulación del patrón de distribución de auxina en respuesta a Ca^{2+} (Hazak et al., 2014, 2019). Esto podría indicar que el papel de LjRIP5 durante el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno está relacionada con las oscilaciones de calcio durante las etapas tempranas y con la regulación hormonal, principalmente la distribución de auxina. Desafortunadamente, el mecanismo por el cual actúa permanece desconocido.

Finalmente, a 7 DPI *rip7.3* no presentó un fenotipo distinto a la silvestre, salvo en la longitud de raíz principal, que fue de menor tamaño. En el árbol filogenético LjRIP7 se encuentra alejada de las RIPs de *A. thaliana* que se han estudiado y están relacionadas con el reacomodo de citoesqueleto o la señalización dependiente de Ca^{2+} . Esto nos indica que probablemente LjRIP7 no está involucrada en el establecimiento de la simbiosis o que posiblemente existe redundancia

funcional entre los miembros de la familia RIP, por lo tanto, no se observa un fenotipo distinto al silvestre durante etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis.

Desarrollo del nódulo y simbiosoma.

A 28 DPI, se analizaron los cambios en etapas posteriores del establecimiento de la simbiosis, como lo son la formación de nódulos y su maduración. Durante esta etapa encontramos que únicamente *ric1.1* y *rip5.1* presentaron diferencia significativa en la relación de número de nódulos/cm de raíz a 28 DPI (Figura 17). También se encontró que la producción de nódulos maduros es la que se ve afectada en las líneas *ric1.1* y *rip5.1* (Figura 16) sugiriendo que tanto RIC1 como RIP5 están involucradas en el proceso de producción y maduración de nódulos. Como se mencionó anteriormente, tanto las proteínas RIC como las RIP están involucradas principalmente en el reacomodo del citoesqueleto en *A. thaliana*, por lo tanto, es probable que los fenotipos observados en las líneas mutantes *ric1.1* y *rip5.1* durante el desarrollo de los nódulos y simbiosomas en *L. japonicus* estén relacionados con este proceso de reacomodo de filamentos de actina y microtúbulos que son tan importantes durante este proceso.

Es interesante que, en esta etapa las diferencias en el fenotipo si resulten significativas, dado que como mencionábamos en el apartado anterior, en el árbol filogenético obtenido para las proteínas RIC (Figura 18) y los datos de expresión de Kelly et. al 2018 (Anexo 3), LjRIC1 y LjRIC4 están súmamente relacionados, y a 7DPI pareciera que RIC4 presenta redundancia funcional con RIC1, por lo que no se observa diferencia de fenotipo en la línea *ric1.1*. ¿Por qué a 28 DPI si se observa un cambio significativo? Especulamos que a 28 DPI tener a RIC4 intacto en la línea de *L. japonicus ric1.1* no es suficiente para contrarrestar el fenotipo por la mutación que existe en el gen que codifica para RIC1, es decir que las proteínas RIC1 y RIC4 actúan de manera conjunta durante esta etapa, por lo tanto, si una de las dos está ausente o en menor concentración, se encontrarán afectaciones. No obstante, el mecanismo por el que actúan debe determinarse todavía. También es probable que su participación durante el establecimiento de la simbiosis esté regulada en tiempo y espacio, dado que únicamente presenta un fenotipo distinto a la silvestre en etapas tardías que se observa como una disminución en el número de nódulos/cm de raíz y en menor número de nódulos maduros por planta, desafortunadamente no sabemos de qué manera se da esta regulación.

Por otro lado, se ha encontrado que las proteínas RIP también están involucradas durante el proceso de exocitosis, entonces si para lograr el desarrollo de los simbiosomas de manera exitosa se requiere de las vías de exocitosis y endocitosis, es probable que el fenotipo observado en *rip5.1* también esté relacionado a una afectación en la vía de exocitosis. Sin embargo, LjRIP5 en el análisis filogenético (Figura 19) se encuentra estrechamente relacionado a AtRIP1 (ICR1), que se ha encontrado involucrado principalmente en la regulación de la distribución de auxina en respuesta a auxina, donde los niveles de ICR1 aumentan en respuesta a auxina, y en consecuencia se da la distribución de auxina (Hazak et al., 2014, 2019). Por lo tanto, podríamos sugerir que en la mutante de *L. japonicus rip5.1*, al estar afectada esta proteína (LjRIP5), también se está afectando la distribución de auxina, lo que conlleva a una acumulación de esta hormona,

que explicaría el aumento de hilos de infección en etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis, debido a que la auxina promueve la infección rizobial (Lin *et al.*, 2020). Mientras que durante el desarrollo de nódulos, los niveles de auxina y su distribución son fundamentales para que pueda llevarse a cabo el proceso de manera exitosa, por lo que, si se afecta la presencia o distribución de auxina, el número de nódulos también es afectado (Lin *et al.*, 2020). Por lo tanto, el fenotipo observado en *rip5.1* parece estar mejor relacionado con la regulación hormonal, principalmente auxina. El mecanismo por el que actúan debe determinarse todavía.

Finalmente, *rip7.3* al igual que en etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis, no presentó diferencia de fenotipo con respecto a la silvestre; esto nos permite sugerir que LjRIP7 puede no tener una participación en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *L. japonicus* y *M. loti* o que existe redundancia funcional entre los miembros de la familia RIP.

CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. Se confirmó el genotipo homocigoto mutante de las plantas en la generación M3 y se concluyó la fenotipificación de las líneas mutantes *ric* y *rip*.
2. Se encontraron fenotipos distintos al silvestre en algunas líneas *ric* y *rip* que nos permitieron sugerir que existen miembros de las familias de efectores RIC y RIP que participan en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *L. japonicus* y *M. loti*.
3. LjRIC1 parece tener una participación únicamente en el proceso de producción y maduración de nódulos.
4. LjRIP5 parece estar participando tanto en etapas tempranas del establecimiento de la simbiosis como en etapas tardías, sin embargo, el papel que desempeña deriva en fenotipos opuestos entre etapas tempranas y etapas más avanzadas, posiblemente relacionado a la distribución de auxina.
5. LjRIP3 parece no estar participando en el establecimiento de la simbiosis, dado que presenta la ausencia de expresión en las raíces de acuerdo con los datos de Kelly *et al.*, 2018 (Anexo 4).
6. LjRIP7 a pesar de estar expresado en las raíces y primordios de nódulos durante la interacción con *M. loti* no presentó diferencias de fenotipo en las mutantes con respecto a la silvestre, lo que sugiere que probablemente no tiene una participación en el proceso simbiótico o que existe redundancia funcional con otro miembro de la familia.

PERSPECTIVAS

Con la finalidad de poder confirmar que la diferencia de fenotipo que se encontró en este trabajo sea por la mutación de estos genes (*RIC1* y *RIP5*), se podría evaluar qué tipo de afectación a nivel proteína presentan las mutantes por inserción LORE1 *ric* y *rip*; ya sea la producción de proteínas truncas o la ausencia de estas proteínas, así como confirmar la localización de la expresión de los genes *RIC* y *RIP* mediante fusiones transcripcionales en raíces transgénicas de *L. japonicus*. Adicionalmente, se podrían realizar ensayos de reducción de acetileno para determinar la actividad de la nitrogenasa en las líneas *ric* y *rip*.

Además, es necesario evaluar otras líneas mutantes para los mismos genes, ya sean líneas LORE1, o líneas mutantes generadas por el sistema CRISPR-Cas9. También se podrían generar mutantes múltiples mediante cruza o generando líneas con silenciamiento múltiple de genes mediante microRNAs artificiales, y evaluarlas en el contexto de la simbiosis para identificar si existen fenotipos más fuertes, esto con el propósito de identificar si existe redundancia funcional entre los miembros de las familias RIC y RIP. En caso de que se encuentren fenotipos muy fuertes, realizar ensayos de complementación funcional sería importante.

Los datos obtenidos durante este proyecto nos permitieron comenzar a elucidar el mecanismo mediante el cual los miembros RIC y RIP pudieran estar actuando durante el establecimiento de la simbiosis. Por lo tanto, sería interesante confirmar la interacción de estos efectores con las proteínas ROP y también determinar otros interactores de estas proteínas RIC y RIP en *L. japonicus* mediante el sistema de doble híbrido o mediante interactómica y realizar ensayos de colocalización de proteínas con marcadores fluorescentes durante el proceso de establecimiento de la simbiosis.

Se ha descrito que en *A. thaliana* las proteínas RIC y RIP están asociadas al reacomodo del citoesqueleto, por lo que realizar el seguimiento de los componentes del citoesqueleto (filamentos de actina y microtúbulos) en las líneas mutantes *ric1.1* y *rip5.1* es importante para confirmar si el fenotipo obtenido se debe a una afectación en el reacomodo del citoesqueleto por la ausencia de las proteínas RIC1 y RIP5. En el caso de *rip5.1* sería necesario observar el patrón de distribución de auxina a distintos tiempos del proceso de establecimiento de simbiosis, para poder confirmar si el fenotipo observado en este proyecto es por afectaciones en la distribución de esta hormona derivados de la afectación de RIP5.

Finalmente, para seguir explorando la participación de efectores RIC y RIP durante el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno, sería interesante realizar un estudio transcriptómico de las líneas mutantes para RIC1 y RIP5 para poder determinar si la ausencia de estas proteínas provoca cambios a nivel transcripcional que puedan estar repercutiendo en el proceso del establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *L. japonicus* y *M. loti*.

ANEXOS

1. Soluciones para tinción LacZ

Solución de fijación (Glutaraldehído 1.25%, Buffer de fosfato de sodio 0.04M) 50 ml.

27.5 ml H₂O_{dd}

2.5 ml Glutaraldehído 25%

20 ml Buffer de fosfato de sodio 0.1M

Solución de Tinción (Buffer de fosfato de sodio 0.086M, Ferricianuro de Potasio 5mM, Ferrocianuro de potasio 5mM, X-gal 0.08%). 50 ml.

43 ml Buffer de fosfato de sodio 0.1M

2.5 ml Ferricianuro de potasio 100mM

2.5 ml Ferrocianuro de potasio 100mM

2 ml X-gal DMSO 2% (0.02g en 1ml de DMSO)

Solución I Fase de aclaramiento (HCl 0.24N, metOH 20%) 25 ml.

0.6 ml HCl 1N

5 ml metOH

19.4 ml H₂O_{dd}

Solución II Fase de aclaramiento (NaOH 7%, EtOH 60%) 25 ml

4.375 ml NaOH 10N

15 ml EtOH

5.625 ml H₂O_{dd}

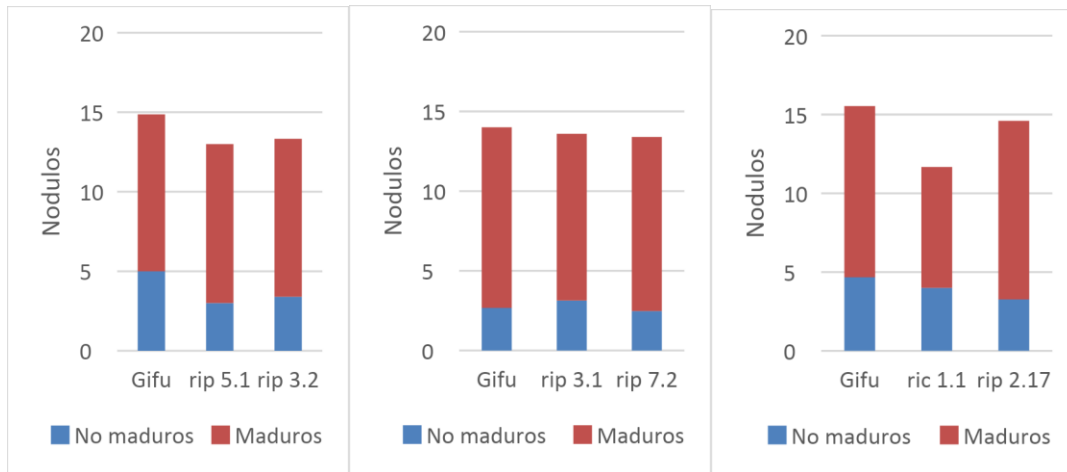
Solución III Fase de aclaramiento (EtOH 5%, Glicerol 25%) 25 ml

1.25 ml EtOH

6.25 ml glicerol

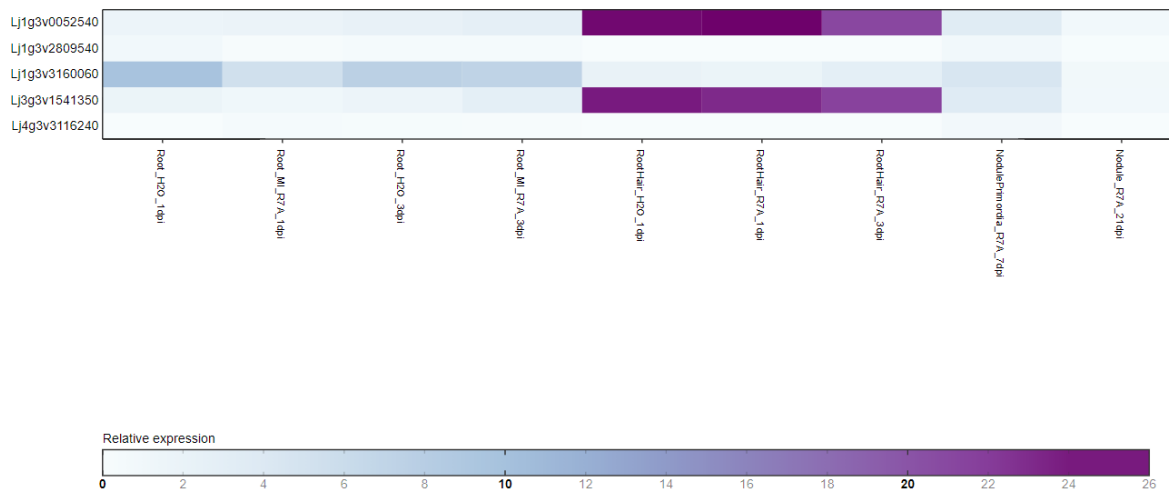
17.5 ml H₂O_{dd}

2. Graficas de barras apiladas del conteo de nódulos en raíces de 28DPI del escrutinio para elección de candidatos.



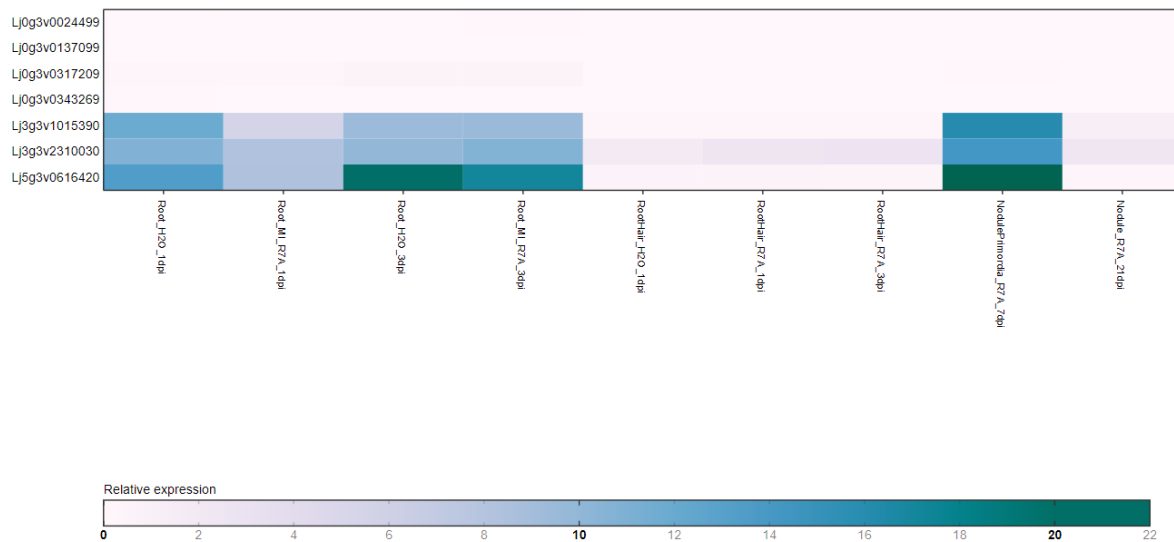
En todas las gráficas, se graficó el promedio de nódulos contados en las raíces de 28 DPI para cada muestra representada por n=15.

3. Heatmap de datos de expresión de genes *RIC*.



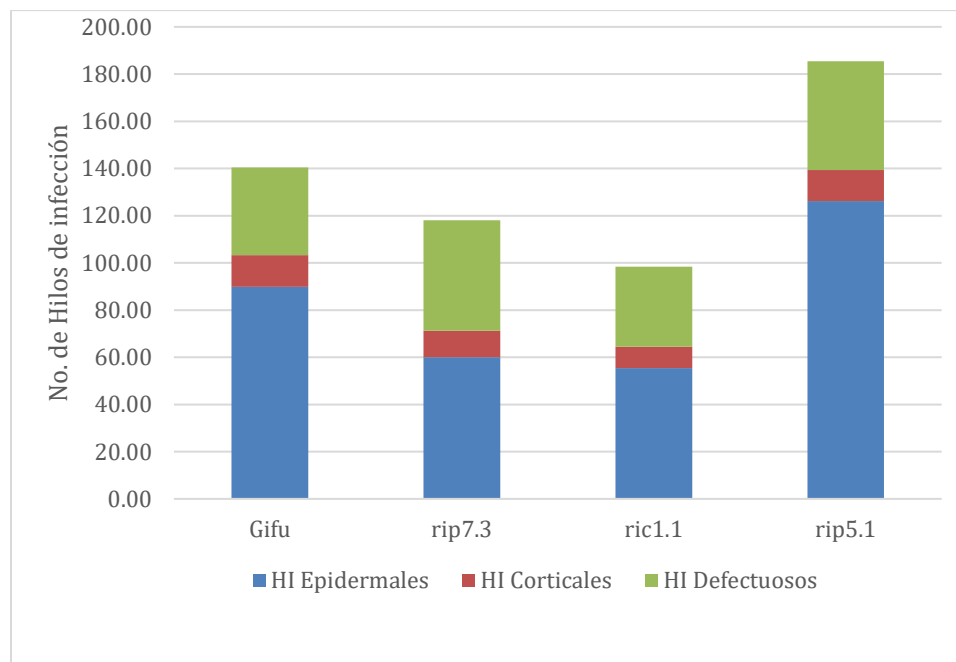
Datos obtenidos del set Kelly et. al, 2017 RNAseq, en https://lotus.au.dk/expat/?ids-input=&ids=Lj1g3v0052540%2CLj1g3v2809540%2CLj1g3v3160060%2CLj3g3v1541350%2CLj4g3v3116240&dataset=rnaseq-kellys-2017-microbialspectrum&conditions=Root_H2O_1dpi%2CRoot_Ml_R7A_1dpi%2CRoot_H2O_3dpi%2CRoot_Ml_R7A_3dpi%2CRootHair_H2O_1dpi%2CRootHair_R7A_1dpi%2CRootHair_R7A_3dpi%2CNodulePrimordios_R7A_7dpi%2CNodule_R7A_21dpi&data_transform=false&idtype=geneid

4. Heatmap de datos de expresión de genes *RIP*.



Datos obtenidos del set Kelly et. al, 2017 RNAseq, en https://lotus.au.dk/expat/index.php?ids-input=&ids=Lj0g3v0024499%2CLj0g3v0137099%2CLj0g3v0317209%2CLj0g3v0343269%2CLj3g3v1015390%2CLj3g3v2310030%2CLj5g3v0616420&dataset=rnaseq-kellys-2017-microbialspectrum&conditions=Root_H2O_1dpi%2CRoot_Ml_R7A_1dpi%2CRoot_H2O_3dpi%2CRoot_Ml_R7A_3dpi%2CRootHair_H2O_1dpi%2CRootHair_R7A_1dpi%2CRootHair_R7A_3dpi%2CNodulePrimordios_R7A_7dpi%2CNodule_R7A_21dpi&data_transform=false&idtype=geneid

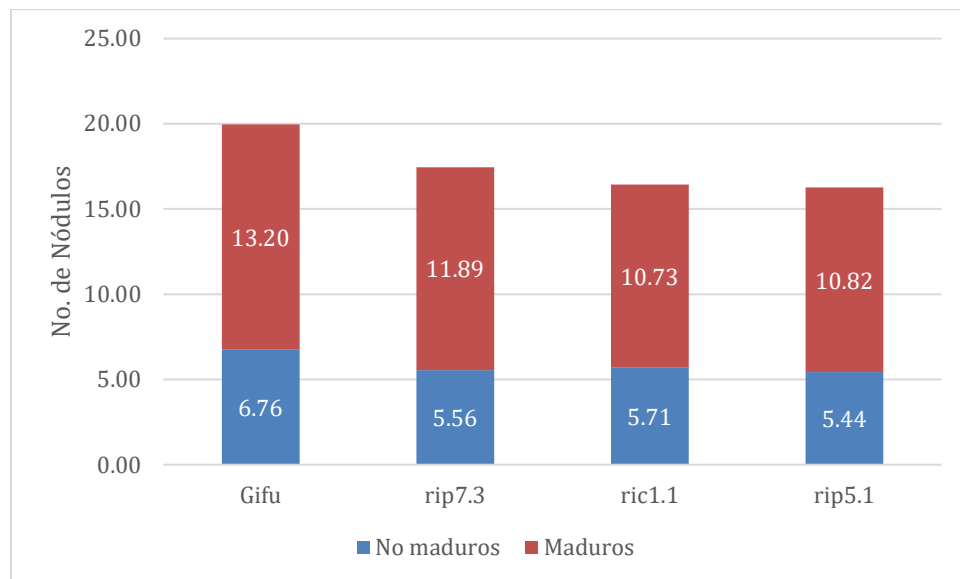
5. Gráfico de barras apiladas para el conteo de Hilos de infección en raíces de 7DPI.



Se graficó el promedio de HI contados en las raíces de 7DPI. Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con n=10.

Muestra	HI epidermales	HI corticales	HI defectuosos	HI Totales
Gifu	89.90	13.33	37.13	140.37
<i>rip7.3</i>	60.00	11.26	46.74	118.00
<i>ric1.1</i>	55.34	9.14	33.93	98.41
<i>rip5.1</i>	126.20	13.13	46.10	185.43

6. Gráfico de barras apiladas del conteo de nódulos en raíces de 28DPI.



Se graficó el promedio de nódulos contados en las raíces de 28 DPI. Cada muestra está representada por los datos conjuntos de tres réplicas biológicas con n=15.

BIBLIOGRAFÍA

- Beatty, P. H., & Good, A. G. (2011). Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science*, 333(6041), 416–417. <https://doi.org/10.1126/science.1209467>
- Berken, A. (2006). ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci*, 63(21), 2446–2459. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6197-1>
- Bloch, D., Hazak, O., Lavy, M., & Yalovsky, S. (2008). A novel ROP/RAC GTPase effector integrates plant cell form and pattern formation. *Plant Signaling and Behavior*, 3(1), 41–43. <https://doi.org/10.4161/psb.3.1.4838>
- Craddock, C., Lavagi, I., & Yang, Z. (2012). New insights into Rho signaling from plant ROP/Rac GTPases. *Trends Cell Biol*, 22(9), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.002>
- Earth: In Depth*. (s/f). NASA Solar System Exploration. <https://solarsystem.nasa.gov/planets/earth/indepth>
- Eutrofización*. (2018). Ecology; EcuRed. <https://www.ecured.cu/Eutrofización>
- Feiguelman, G., Fu, Y., & Yalovsky, S. (2018). ROP GTPases Structure-Function and Signaling Pathways. *Plant Physiol*, 176(1), 57–79. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01415>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., Chu, X., & Gresshoff, P. M. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell and Environment*, 42(1), 41–51. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- Fu, Y., Gu, Y., Zheng, Z., Wasteneys, G., & Yang, Z. (2005). Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell*, 120(5), 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.026>
- Fu, Y., Xu, T., Zhu, L., Wen, M., & Yang, Z. (2009). A ROP GTPase Signaling Pathway Controls Cortical Microtubule Ordering and Cell Expansion in Arabidopsis. *Current Biology*, 19(21), 1827–1832. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.052>
- Genre, A., & Russo, G. (2016). Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant–microbe interactions? En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Número FEB2016, p. 96). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00096>
- Genre, A., & Timmers, T. (2019). The symbiotic role of the actin filament cytoskeleton. *New Phytologist*, 221(2), 611–613. <https://doi.org/10.1111/nph.15506>
- Gu, Y., Fu, Y., Dowd, P., Li, S., Vernoud, V., Gilroy, S., & Yang, Z. (2005). A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *Journal of Cell Biology*, 169(1), 127–138. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409140>
- Hazak, O., Mamon, E., Lavy, M., Sternberg, H., Behera, S., Schmitz-Thom, I., Bloch, D., Dementiev, O., Gutman, I., Danziger, T., Schwarz, N., Abuzeineh, A., Mockaitis, K., Estelle, M., Hirsch, J. A., Kudla, J., & Yalovsky, S. (2019). A novel Ca²⁺-binding protein that can rapidly transduce auxin

- responses during root growth. *PLoS Biology*, *17*(7), e3000085.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000085>
- Hazak, O., Obolski, U., Prat, T., Friml, J., Hadany, L., & Yalovsky, S. (2014). Bimodal regulation of ICR1 levels generates self-organizing auxin distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(50), E5471–E5479.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1413918111>
- Hossain, M. S., Liao, J., James, E. K., Sato, S., Tabata, S., Jurkiewicz, A., Madsen, L. H., Stougaard, J., Ross, L., & Szczyglowski, K. (2012). Lotus japonicus ARPC1 is required for rhizobial infection. *Plant Physiology*, *160*(2), 917–928. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202572>
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics*, *8*(3), 275–282.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>
- Kelly, S., Mun, T., Stougaard, J., Ben, C., & Andersen, S. U. (2018). Distinct lotus japonicus transcriptomic responses to a spectrum of bacteria ranging from symbiotic to pathogenic. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1218. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01218>
- Kitaeva, A. B., Demchenko, K. N., Tikhonovich, I. A., Timmers, A. C. J., & Tsyganov, V. E. (2016). Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of Medicago truncatula and Pisum sativum: Bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements. *New Phytologist*, *210*(1), 168–183.
<https://doi.org/10.1111/nph.13792>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., & Yalovsky, S. (2007). A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr Biol*, *17*(11), 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.038>
- Li, S., Gu, Y., Yan, A., Lord, E., & Yang, Z. B. (2008). RIP1 (ROP Interactive Partner 1)/ICR1 marks pollen germination sites and may act in the ROP1 pathway in the control of polarized pollen growth. *Molecular Plant*, *1*(6), 1021–1035. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn051>
- Lin, J., Frank, M., & Reid, D. (2020). No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis. *Plant Communications*, *1*(5), 100104.
<https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100104>
- Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N., & Wang, E. (2018). Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, *60*(8), 632–648.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12653>
- Małolepszy, A., Mun, T., Sandal, N., Gupta, V., Dubin, M., Urbański, D., Shah, N., Bachmann, A., Fukai, E., Hirakawa, H., Tabata, S., Nadzieja, M., Markmann, K., Su, J., Umehara, Y., Soyano, T., Miyahara, A., Sato, S., Hayashi, M., ... Andersen, S. U. (2016). The LORE1 insertion mutant resource. *Plant Journal*, *88*(2), 306–317. <https://doi.org/10.1111/tpj.13243>
- Mejía-Martínez, B. G. (2019). *FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE LOS MUTANTES DE Lotus japonicus: ric, rip*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A. E., Barloy-Hubler,

- F., Galibert, F., Kondorosi, A., & Kondorosi, E. (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(13), 5230–5235. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600912103>
- Mucha, E., Hoefle, C., Hückelhoven, R., & Berken, A. (2010). RIP3 and AtKinesin-13A - A novel interaction linking Rho proteins of plants to microtubules. *European Journal of Cell Biology*, *89*(12), 906–916. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.08.003>
- Nagawa, S., Xu, T., & Yang, Z. (2010). RHO GTPase in plants: Conservation and invention of regulators and effectors. *Small GTPases*, *1*(2), 78–88. <https://doi.org/10.4161/sgtp.1.2.14544>
- Oldroyd, G. E. D., & Dixon, R. (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology*, *26*, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.006>
- Ott, T., Van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., & Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*, *15*(6), 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.042>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant cell*, *32*(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Sampathkumar, A., Lindeboom, J. J., Debolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D. W., Ketelaar, T., & Persson, S. (2011). Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in arabidopsis. *Plant Cell*, *23*(6), 2302–2313. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087940>
- Stiller, J., Martirani, L., Tuppale, S., Chian, R. J., Chiurazzi, M., & Gresshoff, P. M. (1997). High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume Lotus japonicus. *Journal of Experimental Botany*, *48*(312), 1357–1365. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.7.1357>
- Timmers, A. C. J. (2008). The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *Journal of Microscopy*, *231*(2), 247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02040.x>
- Wu, G., Gu, Y., Li, S., & Yang, Z. (2001). A Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Rop-Interactive CRIB Motif-Containing Proteins That Act as Rop GTPase Targets. *The Plant Cell*, *13*(12), 2841–2856. <https://doi.org/10.1105/tpc.010218>
- Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L. H., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., Held, M., Hossain, M. S., Szczyglowski, K., Morieri, G., Oldroyd, G. E., Downie, J. A., Nielsen, M. W., Rusek, A. M., Sato, S., Tabata, S., James, E. K., Oyaizu, H., Sandal, N., & Stougaard, J. (2009). Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of Lotus japonicus roots by Mesorhizobium loti. *Plant Cell*, *21*(1), 267–284. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063693>
- Zhang, X., Han, L., Wang, Q., Zhang, C., Yu, Y., Tian, J., & Kong, Z. (2019). The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in Medicago truncatula. *New Phytologist*, *221*(2), 1049–1059. <https://doi.org/10.1111/nph.15423>

Zhou, Z., Shi, H., Chen, B., Zhang, R., Huang, S., & Fu, Y. (2015). Arabidopsis RIC1 severs actin filaments at the apex to regulate pollen tube growth. *Plant Cell*, 27(4), 1140–1161.
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.135400>

