



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis funcional de una tetraspanina (PvTET8) de *Phaseolus vulgaris*
bajo condiciones de nodulación y micorrización

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Thelma Jacqueline Parra Aguilar

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Cárdenas Torres
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Miguel Lara Flores
Instituto de Biotecnología

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega
Centro de Ciencias Genómicas

Ciudad de México. Octubre, 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.

El presente trabajo se realizó en el Consorcio de Mutualismo en Plantas adscrito al Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La investigación se realizó gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca de maestría No. 957208 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA, UNAM, IN210321. También se contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la participación al “XVIII National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology”.

Dedicatoria

A mis padres Irene Aguilar y Francisco Parra, quienes son el mejor ejemplo a seguir. Les agradezco todo lo que me han dado en la vida.

A mis hermanos Alfonso, Emmanuel y Julio, quienes siempre han estado presentes en cualquier adversidad. Gracias por hacerme ver la vida de otra forma.

A Alan Fuentes por apoyarme en todos los aspectos durante la difícil etapa de la maestría, y por compartir tantos momentos juntos.

Agradecimientos

Al **Instituto de Biotecnología** por la gran comunidad que lo forma. Siempre estaré orgullosa de haberme desarrollado profesionalmente en sus instalaciones.

Al **Dr. Luis Cárdenas Torres** por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su asesoría a lo largo de la maestría y por su apoyo incondicional en todo momento. Gracias por todo.

A los técnicos **Olivia Santana, Juan Olivares** y **Noreide Nava** por la ayuda, las enseñanzas y los consejos brindados a lo largo de mi estancia en el IBT. Asimismo, agradezco al **Dr. Alfonso Leija** por su apoyo con el ensayo de reducción de acetileno.

Al **Dr. Miguel Lara** y al **Dr. Mario Serrano** por formar parte de mi comité tutorial. Sus observaciones y aportaciones fueron cruciales para el avance y el término del proyecto.

A los miembros del jurado, **Dra. Alejandra Covarrubias, Dr. Arturo Guevara, Dr. Christian Sohlenkamp, Dr. Jesús Aguirre** y **Dr. Damien Formey**, por su valiosa revisión de la tesis. Les agradezco inmensamente su atención y tiempo.

A todos los compañeros del laboratorio que me apoyaron directa o indirectamente con la realización del proyecto. Especialmente agradezco al **M. en C. Edgar Pascual** y al **Dr. Luis Sarmiento** por sus valiosas enseñanzas, apoyo y compañía en los momentos más difíciles.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
Nodulación	7
Micorrización	10
Tráfico vesicular en la simbiosis	14
Exosomas y comunicación intercelular	17
Tetraspaninas.....	18
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	21
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	23
General	23
Particulares	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Esquema metodológico	24
Análisis bioinformático	24
Construcciones moleculares.....	25
Desinfección y germinación de semillas	29
Plantas compuestas	29
Localización subcelular de PvTET8 en <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>P. vulgaris</i>	29
Inoculación de las plantas compuestas con <i>Rhizobium tropici</i>	30
Ensayo de reducción de acetileno	31
Inoculación de las plantas compuestas con <i>Rhizophagus irregularis</i>	31
Tinción histoquímica para la β -glucuronidasa	32
Marcaje de micorrizas con WGA-Alexa Fluor 488.....	32
Tinción y cuantificación de la colonización micorrícica.....	33
Análisis de expresión de genes	34
Detección de superóxido mediante la tinción de NBT	35
Análisis estadístico	35
RESULTADOS.....	36

DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	65
PERSPECTIVAS	66
REFERENCIAS	66

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AM: micorrícica arbuscular

AMF: hongos micorrícicos arbusculares

ANOVA: análisis de varianza

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

cDNA: ADN complementario

CDS: secuencia codificante

dpi: días después de la inoculación

ERO: especies reactivas de oxígeno

EXPO: orgánulo positivo exocisto

Factores Nod: factores de nodulación

Factores Myc: factores de micorrización

GFP: proteína verde fluorescente

GUS: β -glucuronidasa

M+: plantas colonizadas con hongos micorrícicos

M-: plantas sin colonización de hongos micorrícicos

MVB: cuerpos multivesiculares

NBT: nitroazul de tetrazolio

PAM: membrana periarbuscular

PAS: espacio periarbuscular

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PPA: aparato de prepenetración

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

RNAi: ARN interferente

SD: desviación estándar

sRNA: ARN pequeño

TEM: microdominios enriquecidos en tetraspaninas

TGN/EE: red trans-Golgi/endosoma temprano

UTR: región no traducida

VE: vesículas extracelulares

WGA: aglutinina del germen de trigo

RESUMEN

La micorrización arbuscular y la nodulación son las asociaciones mutualistas más importantes que establecen las plantas, ya que les permiten mejorar la disponibilidad y la adquisición de fósforo y nitrógeno bajo condiciones de deficiencia de nutrientes. Para el establecimiento y el desarrollo de ambos procesos simbióticos, se requiere de un diálogo molecular que induce diversas respuestas en la planta, como las oscilaciones de calcio, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la reorganización celular y el tráfico vesicular. Dichas respuestas, permiten la invasión y la internalización del simbionte en las raíces de las plantas. Las tetraspaninas son proteínas transmembranales que permiten la formación de microdominios en donde se pueden reclutar diversas proteínas específicas. Esta propiedad hace que las tetraspaninas participen en la comunicación celular, la fusión de membranas, la diferenciación celular, el tráfico vesicular y la biogénesis de exosomas. De hecho, la TETRASPANINA 8 de *Arabidopsis* (AtTET8) se ha identificado como un componente clave para la respuesta por infección a patógenos y en general para la comunicación inter-reinos a través de la formación de exosomas, y el gen de su ortóloga en *Phaseolus vulgaris*, *PvTET8*, incrementa su expresión ante la inoculación con rizobios. Por lo anterior, resultó de particular interés determinar el papel funcional de la tetraspanina PvTET8 durante la nodulación y la simbiosis micorrícica arbuscular. Para ello, se generaron plantas compuestas de *P. vulgaris* en las que se analizó la actividad del promotor de este gen bajo condiciones de micorrización y se determinó la localización subcelular de la proteína PvTET8. Además, se evaluaron los fenotipos de sobreexpresión y silenciamiento del gen *PvTET8* en relación con la nodulación y la micorrización. Los resultados muestran que la sobreexpresión del gen *PvTET8* incrementó significativamente el número, el tamaño y la biomasa de los nódulos. Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno por peso seco de nódulos se redujo. Consistente con esto, el silenciamiento del gen *PvTET8* disminuyó la formación, el tamaño y la fijación biológica del nitrógeno de los nódulos, con respecto a su control. En cuanto a la micorrización, la sobreexpresión del gen *PvTET8* indujo un aumento en la frecuencia de arbusculos, mientras que el silenciamiento redujo la colonización micorrícica. En conjunto, estos resultados sugieren que PvTET8 posee un papel en el establecimiento de la nodulación y la micorrización arbuscular en *P. vulgaris*, tanto en la colonización por los endosimbiontes, como en la formación, la maduración y el funcionamiento de los nódulos y los arbusculos.

ABSTRACT

The root-nodule and arbuscular mycorrhiza symbiosis are the most important mutualistic interactions in plants facilitating nitrogen and phosphorus uptake under conditions of limited nutrient availability. The efficient establishment of these symbioses requires many responses and mechanisms, such as the release of signal molecules, calcium oscillations, production of reactive oxygen species (ROS), cell reorganization and symbiont accommodation by vesicular trafficking. Tetraspanins are transmembrane proteins forming microdomains to which several specific proteins are recruited; this property makes tetraspanins key players in cell communication, membrane fusion, cell differentiation, vesicular trafficking and exosome biogenesis. In fact, the *Arabidopsis* TETRASPANIN 8 (AtTET8) has been identified as a key component for the response to pathogen infection and for interkingdom communication, by regulating exosome formation. The tetraspanin orthologue in *Phaseolus vulgaris*, *PvTET8*, increases its expression upon rhizobia inoculation. Therefore, we wanted to address the role of *PvTET8* in root-nodule and arbuscular mycorrhiza symbiosis in detail. We generated *P. vulgaris* transgenic roots to answer questions such as the subcellular *PvTET8* localization, and the promoter activity during mycorrhizal fungi colonization. Furthermore, we did overexpression and silencing experiments with *PvTET8* to determine the phenotype. We found that *PvTET8* protein localizes to the plasma membrane and to intracellular vesicles. Additionally, we observed that the *PvTET8* promoter was expressed in cells with arbuscule development. Compared with the control, *PvTET8* overexpression in roots generated more nodules of greater size and biomass, but with reduced nitrogenase activity. *PvTET8* overexpression also increased the frequency of arbuscules and *PvPT4* expression. In addition, *PvTET8* silencing reduced the number of roots nodules, which were smaller, had little rhizobia colonization and were less efficient in nitrogen fixation than the control; these roots also generated fewer arbuscules and presented a decreased *PvPT4* expression. These results suggest that *PvTET8* is necessary for rhizobia and mycorrhizal fungi colonization, as well as for the development, maturation and functioning of nodules and arbuscules.

INTRODUCCIÓN

Las plantas, al ser organismos sésiles, están bajo constante estrés de tipo biótico y abiótico, y han desarrollado mecanismos que les permiten responder de manera eficiente e inmediata. Dentro del estrés biótico se encuentra el ataque por microorganismos patógenos y el establecimiento de interacciones con microorganismos benéficos. En este sentido, una de las maneras en que las plantas pueden reconocer a los microorganismos es mediante una comunicación molecular con la que la planta genera respuestas adecuadas para el establecimiento o el bloqueo de estas interacciones (Gu *et al.*, 2017; Karban, 2015). Así mismo, los microorganismos han desarrollado la capacidad de reconocer las señales liberadas por las plantas para poder proliferar o establecer interacciones mutualistas (Abdel-Lateif *et al.*, 2012; Parniske, 2005). Dentro de las interacciones mutualistas se encuentran las asociaciones endosimbióticas, que incluyen a la nodulación y a la micorrización arbuscular. Ambas interacciones se consideran mutualistas debido al beneficio nutricional que ambos organismos obtienen el uno del otro. Para las plantas, estas asociaciones les proporcionan una fuente importante de nutrientes minerales, particularmente nitrógeno y fósforo, que favorecen su crecimiento y desarrollo (Oldroyd, 2013). Por lo tanto, el estudio de estas relaciones simbióticas para la generación de conocimiento que eventualmente permita su manipulación, constituye una alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos y mejorar la productividad de los cultivos.

Las asociaciones mutualistas han estado presentes desde el inicio del proceso de colonización de la superficie terrestre por parte de las plantas (Redecker *et al.*, 2000). Particularmente, la micorrización arbuscular, surgió hace 460 millones de años, mientras que la nodulación es un evento más reciente, estimado en aproximadamente 60 millones de años (Redecker *et al.*, 2000; Sprent, 2008). Tomando en cuenta lo anterior, existen pruebas que sugieren que muchos de los genes implicados en la micorrización se reclutaron posteriormente para el desarrollo de la nodulación, originando que algunos genes resultaran esenciales para ambas interacciones. A esta red genética compartida se le conoce como “vía de señalización común de la simbiosis”, en la que la pérdida de función de alguno de estos genes tiene un efecto deletéreo, tanto para la nodulación como para la micorrización arbuscular (Delaux *et al.*, 2013; Kistner y Parniske, 2002; Parniske, 2008).

Nodulación

La nodulación, que se establece generalmente entre plantas leguminosas (familia Fabaceae) y los rizobios pertenecientes a la familia Rhizobiaceae, es la asociación mutualista más estudiada (Andrews y Andrews, 2017; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2015). En esta simbiosis, los rizobios inducen la formación de nódulos en la raíz, en donde llevan a cabo la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (N₂) para la obtención del amonio que es asimilado por las plantas. En contraparte, las plantas les proporcionan a las bacterias esqueletos de carbono derivados de la fotosíntesis. La fijación biológica del nitrógeno requiere de aproximadamente 16 moléculas de ATP por cada molécula de N₂, por lo que este proceso energético resulta ser sumamente costoso para las plantas. Por esta razón, la nodulación se desarrolla preferentemente en suelos deficientes de nitrógeno y su establecimiento se mantiene altamente regulado a través de un complejo sistema de señalización entre ambos simbiosis (Murray *et al.*, 2017; Oldroyd, 2013).

De manera general, el establecimiento de la nodulación inicia con una etapa de comunicación química, en donde las raíces de las leguminosas secretan diversos compuestos fenólicos, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides e isoflavonoides (Figura 1A; Liu y Murray, 2016; Redmond *et al.*, 1986). Estas moléculas son reconocidas de manera específica por los rizobios e inducen la expresión de genes bacterianos (genes *nod*) que codifican para proteínas involucradas en la síntesis y la secreción de los factores de nodulación (factores Nod), los cuales son compuestos lipoquitooligosacáridos que actúan como moléculas señal (Fliegmann y Bono, 2015; Lerouge *et al.*, 1990; Oldroyd, 2013). Los factores Nod son específicos de cada rizobio, por lo que pueden diferir en el número de monómeros de *N*-acetilglucosamina que los conforman, así como en la longitud y el grado de saturación del ácido graso. Además, estas moléculas pueden estar modificadas con diversos sustituyentes químicos que les dan la identidad que requieren para el reconocimiento específico por la planta hospedera (Figura 1B; Fliegmann y Bono, 2015). Las plantas reconocen a los factores Nod de manera específica a través de receptores de tipo cinasa con motivos de lisina (LysM-RLK) localizados en la membrana plasmática de los pelos radicales (Fliegmann y Bono, 2015; Peters, 1997). El reconocimiento de los factores Nod desencadena la activación de una vía de señalización que permite encender todo un programa de desarrollo que controla la formación del hilo de infección y del primordio del nódulo (Jones *et al.*, 2007; Kistner *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2020).

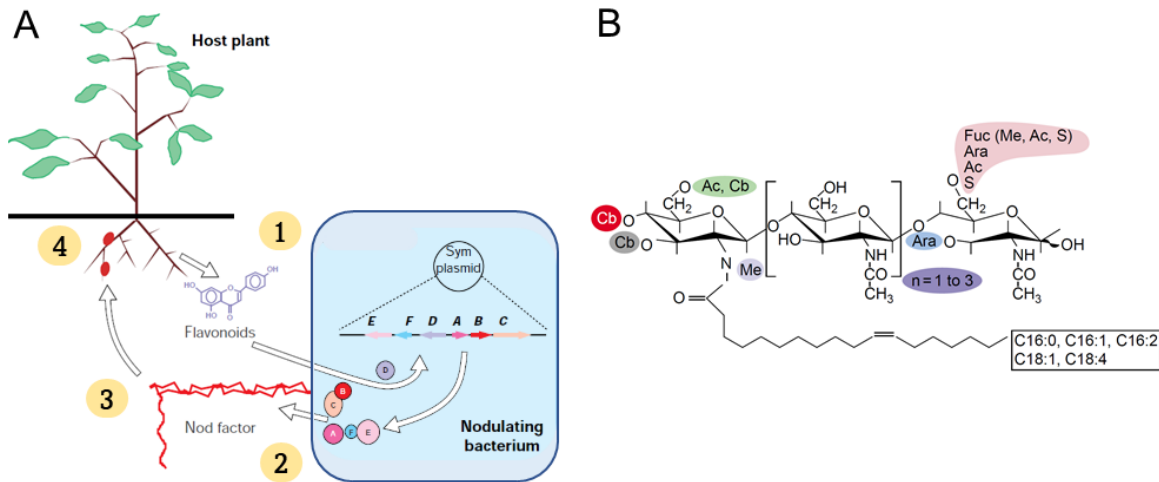


Figura 1. A) Principales etapas de la nodulación. (1) Los exudados de las raíces como los flavonoides inducen la expresión de los genes nod de los rizobios, cuyos productos (Factores Nod; 2) inducen la formación de nódulos en las raíces de las plantas leguminosas (3). (4) Los rizobios colonizan a la raíz para completar la formación del nódulo fijador de nitrógeno. B) Estructura química de un factor Nod genérico. Los diferentes colores indican sustituciones (de H) en los factores Nod que se pueden encontrar en las diferentes especies de Rhizobium. También se indican algunas de las variaciones más comunes en la cadena del ácido graso. Ac, acetil; Ara, arabinosil; Cb, carbonil; Fuc, fucosil; Me, metil; S, sulfidril. Esquemas editados de Peters (1997) y Cullimore et al. (2001).

El hilo de infección es una estructura tipo túnel por donde las bacterias ingresan hasta las células del primordio del nódulo; este conducto se forma en los pelos radicales y posteriormente viaja a través de las células del córtex (Figura 2). La formación del hilo de infección requiere de la pérdida de rigidez de la pared celular, un crecimiento polar en sentido opuesto y la invaginación de la membrana plasmática del pelo radical (Suzaki *et al.*, 2015). En este sentido, se tiene que reorganizar la maquinaria exocítica en el ápice del hilo de infección para concentrar un gran número de vesículas que extiendan a la membrana plasmática y que transporten precursores remodeladores de la pared celular. De esta forma, dicho mecanismo sostiene el crecimiento apical durante la invaginación y la migración del hilo de infección (Figura 2; Harrison y Ivanov, 2017; Liu *et al.*, 2019).

De manera simultánea a la formación del hilo de infección, se inicia el desarrollo del nódulo a partir del establecimiento de un primordio. Este proceso involucra una alta sincronía temporal y espacial con el desarrollo del hilo de infección. El primordio del nódulo se forma inicialmente por la dediferenciación de las células del córtex y el reinicio de la división celular. Esta transición está regulada en gran medida por la actividad de fitohormonas como las auxinas, que se acumulan en las zonas en donde se forma el primordio del nódulo (Kohlen *et al.*, 2018). Posteriormente, ocurre la diferenciación de las células del nódulo para formar a

los diversos tipos celulares, como las células infectadas, las no infectadas y los haces vasculares (Geurts *et al.*, 2016). En las leguminosas se han descrito dos tipos de nódulos, los “indeterminados” y los “determinados”. Los nódulos indeterminados (desarrollados en alfalfa, por ejemplo) se caracterizan por tener un meristemo permanentemente activo y una forma alargada. Los nódulos determinados (desarrollados en frijol, por ejemplo) tienen una morfología esférica con meristemos que pierden su actividad una vez formado el nódulo (Quinto y Cárdenas, 2007; Oldroyd, 2013; Roy *et al.*, 2019).

Cuando el hilo de infección alcanza a las células del primordio del nódulo en el córtex, se ramifica y libera a las bacterias a través de lo que se conoce como “gotas de infección”, que son pequeños compartimentos sin pared celular (Figura 2, sección 5). Estas gotas de infección quedan internalizadas en las células vegetales en un proceso del cual se sabe muy poco; como resultado, los rizobios quedan rodeados de una membrana de origen vegetal que constituyen a los simbiosomas (Harrison y Ivanov, 2017). Los datos más recientes han identificado la presencia de proteínas involucradas en la exocitosis en la membrana del simbiosoma, lo cual ha permitido relacionar a la vía exocítica con la formación de estas estructuras (Catalano *et al.*, 2007; Limpens *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2019).

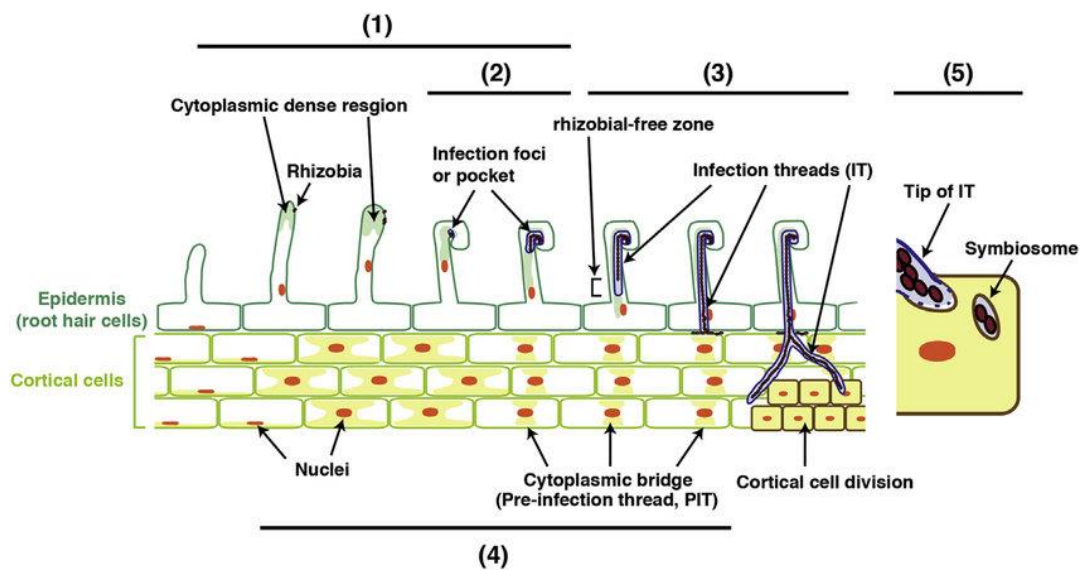


Figura 2. Infección e invasión de *Rhizobium* en las células epidérmicas y corticales de la raíz. (1) Los rizobios se adhieren al pelo radical y los Factores Nod inducen su deformación y enroscamiento. (2) Se produce la degradación de la pared celular y se induce la invaginación de la membrana del hilo de infección (IT) dentro del pelo radical. (3) El IT se alarga siguiendo al núcleo y a un flujo citoplásmico. (4) En las células corticales, se forma un puente citoplásmico (PIT) para guiar a los IT. (5) Cuando el IT alcanza a una célula cortical recién dividida, los rizobios se liberan del IT para formar al simbiosoma. Esquema tomado de Suzaki *et al.* (2015).

Posteriormente, los rizobios alojados en el interior del simbiosoma se diferencian en bacteroides (Figura 3). En este sentido, las células del nódulo maduro les proporcionan a los rizobios un ambiente seguro y rico en nutrientes para que efectúen la fijación biológica del nitrógeno (Figura 3). Los bacteroides pueden reducir al nitrógeno atmosférico gracias a la enzima nitrogenasa, que es altamente sensible a la presencia del oxígeno, por lo que requiere de ambientes hipóxicos. El nódulo establece este ambiente gracias a la alta acumulación de leghemoglobina en las células no infectadas; esta proteína es capaz de reclutar al oxígeno libre para evitar la inactivación de la nitrogenasa, mientras que permite un flujo abundante de oxígeno para la respiración y la producción de ATP que se requiere en la fijación biológica del nitrógeno (Ott *et al.*, 2005). Debido al alto costo energético del proceso de fijación (16 moléculas de ATP), la nodulación se puede inducir o inhibir en función de una baja o alta disponibilidad del nitrógeno (Roy *et al.*, 2019).

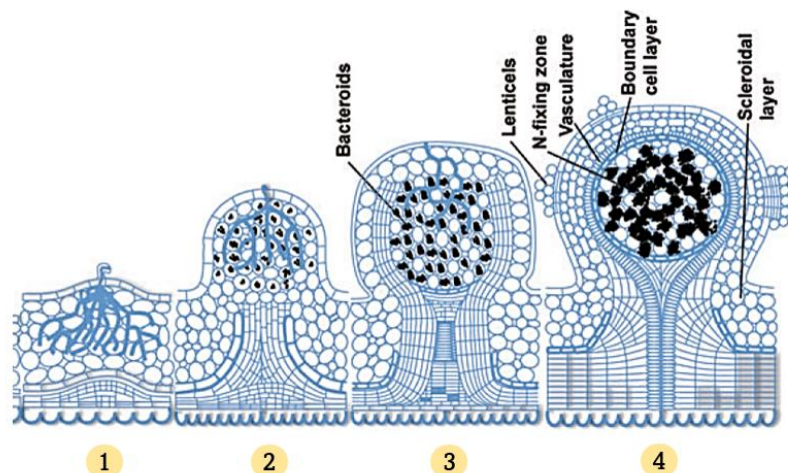


Figura 3. Colonización y maduración del nódulo. (1) Los hilos de la infección progresan hacia el primordio del nódulo. (2) Los rizobios se liberan en gotas de infección, las cuales se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno. (3) Continúa la colonización de los rizobios y la maduración del nódulo. En los nódulos determinados todas sus células infectadas se encuentran en una fase de desarrollo similar. (4) Nódulo maduro fijador de nitrógeno. Esquema modificado de Ferguson *et al.* (2010).

Micorrización

Otra de las interacciones mutualistas más importantes en las plantas es la micorrización, que se establece entre las raíces y los hongos micorrícicos. Dentro de los diversos tipos de micorrización, la simbiosis micorrícica arbuscular (AM, por sus siglas en inglés) se caracteriza por la formación de estructuras fúngicas dentro de las células vegetales, que se especializan en el intercambio de nutrientes. Se estima que del 70 al 90% de las plantas terrestres son

capaces de establecer este tipo de asociación (Parniske, 2008). La simbiosis AM, además de ser la asociación mutualista más extendida en plantas, resulta ser la más antigua, y se ha sugerido que fue fundamental para la colonización inicial de la superficie terrestre por parte de las plantas (Parniske, 2008; Redecker *et al.*, 2000).

Los hongos que establecen la simbiosis AM pertenecen al filum Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001), y son organismos biótrofos obligados que dependen de los ácidos grasos de las plantas para producir su próxima generación de esporas. En la simbiosis, los hongos micorrícicos arbusculares (AMF, por sus siglas en inglés), mejoran la nutrición mineral de las plantas proporcionándoles principalmente fósforo (Finlay, 2008; Parniske, 2008). De hecho, se estima que los hongos AM pueden suministrar del 70 al 100% de la adquisición total del fosfato inorgánico (Pi) a la planta (Choi *et al.*, 2018). Además, la simbiosis AM facilita la absorción de agua, ya que la red de hifas puede aumentar el área de superficie de las raíces e incrementar el contacto con el sustrato (Lanfranco *et al.*, 2016). En contraparte, al igual que en la nodulación, la planta le proporciona a los AMF fuentes importantes de carbohidratos y ácidos grasos. Se estima que estos hongos pueden llegar a consumir hasta el 20% de los productos fotosintéticos, lo cual representa un alto costo energético para las plantas (Bago *et al.*, 2000; Parniske, 2008). Por lo tanto, los efectos benéficos de la micorrización son evidentes en condiciones de limitada disponibilidad de nutrientes. De tal manera, la colonización micorrícica generalmente disminuye cuando el fosfato es abundante y se promueve cuando es escaso (Lanfranco *et al.*, 2016).

Al igual que el proceso de la nodulación, la micorrización involucra un complejo intercambio de señales (Figura 4), que en este caso inicia cuando las raíces de las plantas secretan estrigolactonas. Posteriormente, los hongos AM perciben y reconocen específicamente a esta fitohormona, que estimula a la activación del metabolismo fúngico, la germinación de las esporas y la actividad mitocondrial que lleva a la ramificación de las hifas (Besserer *et al.*, 2006; Parniske, 2008). La activación del metabolismo induce a los hongos AM a producir cadenas cortas de quitooligosacáridos y lipoquitooligosacáridos similares a los factores Nod, por lo que se les conoce como factores de micorrización (factores Myc; Maillet *et al.*, 2011; Shinya *et al.*, 2015). Aunque no se sabe con certeza, aparentemente estos factores podrían ser reconocidos por las plantas a través de receptores tipo LysM-RLK, al igual que ocurre en la nodulación (Girardin *et al.*, 2019). Una vez que los factores Myc son percibidos por las raíces, de manera similar a lo que ocurre en la nodulación, se activa toda una serie de respuestas específicas, como las oscilaciones de calcio perinuclear, que

desencadenan la señalización del proceso simbiótico (Bonfante y Genre, 2015; Choi *et al.*, 2018).

Seguido del reconocimiento del simbiote, las hifas entran en contacto directo con la epidermis de la raíz y forman al hifopodio o apresorio, una estructura amorfa que le permite a las hifas afianzarse a la capa celular más externa de las raíces (Oldroyd, 2013). De cuatro a cinco horas después de la formación del apresorio, las células vegetales forman al aparato de prepenetración (PPA, por sus siglas en inglés), que es un túnel citoplasmático que permite la entrada de las hifas y determina la ruta del crecimiento fúngico a través de las células del córtex de la raíz (Figura 4). El PPA se forma como una membrana plasmática invaginada apoyada por una extensa red de retículo endoplásmico y citoesqueleto. Solo después de que dicho túnel se ha completado, comienza el ablandamiento de la pared celular vegetal en la zona de contacto con el apresorio, permitiendo que el hongo AM comience a colonizar a las células huésped (Choi *et al.*, 2018; Genre, *et al.*, 2008; Parniske, 2000, 2008).

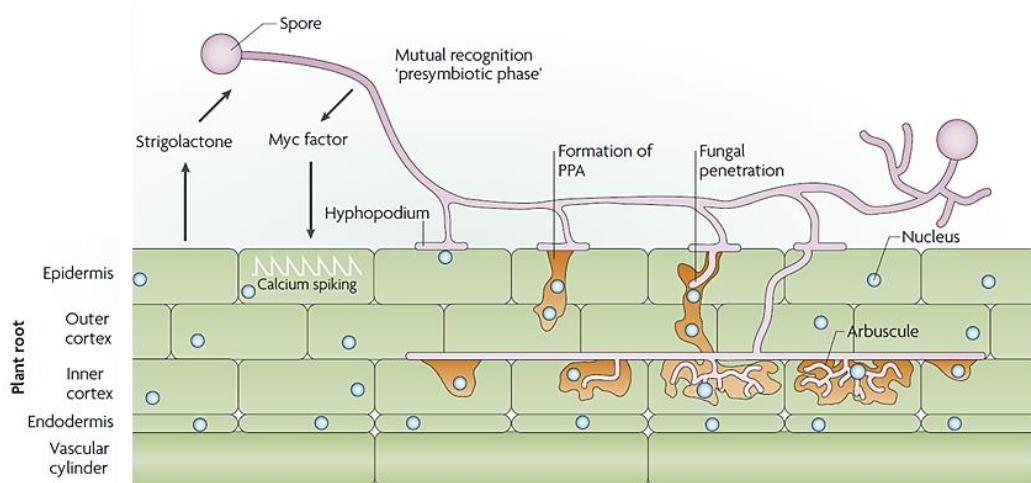


Figura 4. Desarrollo de la micorrización arbuscular. Las plantas secretan exudados que inducen la ramificación de las hifas. En respuesta, los hongos secretan a los factores de micorrización (Myc factor), que inducen oscilaciones de calcio en las células epidérmicas de la raíz y activan a los genes relativos a la simbiosis. Después, a partir de una hifa madura se forma un apresorio especializado llamado hifopodio. Dicha estructura, induce en las células vegetales contiguas la formación del aparato de prepenetración (PPA). Subsecuentemente, la hifa entra en el PPA, el cual guía al hongo a largo de las células del córtex. Aquí, las hifas permanecen en el apoplasto e inducen el desarrollo de estructuras parecidas al PPA en las células del córtex interno. Finalmente, las hifas entran a estas células y se ramifican para formar a los arbuscúlos. Tomada de Parniske (2008).

Después de que las hifas reinician su crecimiento a partir del apresorio, éstas logran atravesar intercelularmente a las células de la epidermis y del córtex externo, hasta llegar al córtex interno de la raíz (Figura 4). En esta etapa, se mantiene una coordinación de la deposición polarizada de la membrana vegetal en el extremo apical de la hifa en crecimiento,

por lo tanto, la célula vegetal utiliza al tráfico vesicular para regular la colonización del hongo AM (Genre *et al.*, 2012). Cuando las hifas alcanzan a las células del córtex interno, se ramifican dicotómicamente y se dividen en ramas más finas para formar a los arbusculos (Figura 5). Como consecuencia, en las células en donde se forman estas estructuras se requiere de una mayor deposición polarizada de membrana, para cubrir a todas las ramas de los arbusculos (Harrison y Ivanov, 2017).

Los arbusculos son las estructuras especializadas en el intercambio de nutrientes y, al igual que los bacteroides, dichas estructuras no están en contacto directo con el citoplasma vegetal, sino que están rodeados por una membrana periarbuscular (PAM, por sus siglas en inglés), que es continua con la membrana plasmática vegetal (Figura 5). Debido a que los arbusculos constituyen el sitio de intercambio de nutrientes, la PAM, al igual que la membrana peribacteroidal, tiene una especialización funcional, por lo que contienen proteínas únicas, como canales, transportadores y bombas de protones (Harrison *et al.*, 2002; Harrison y Ivanov, 2017; Parniske, 2008). Asimismo, existe un compartimiento apoplástico entre la PAM y la pared celular del hongo, al que se le denomina espacio periarbuscular (PAS, por sus siglas en inglés; Figura 5), que constituye un ambiente altamente regulado, ya que a través de éste se coordinan los procesos de transporte de nutrientes y de comunicación celular entre la planta y el hongo AM (Lanfranco *et al.*, 2016; Limpens, 2019).

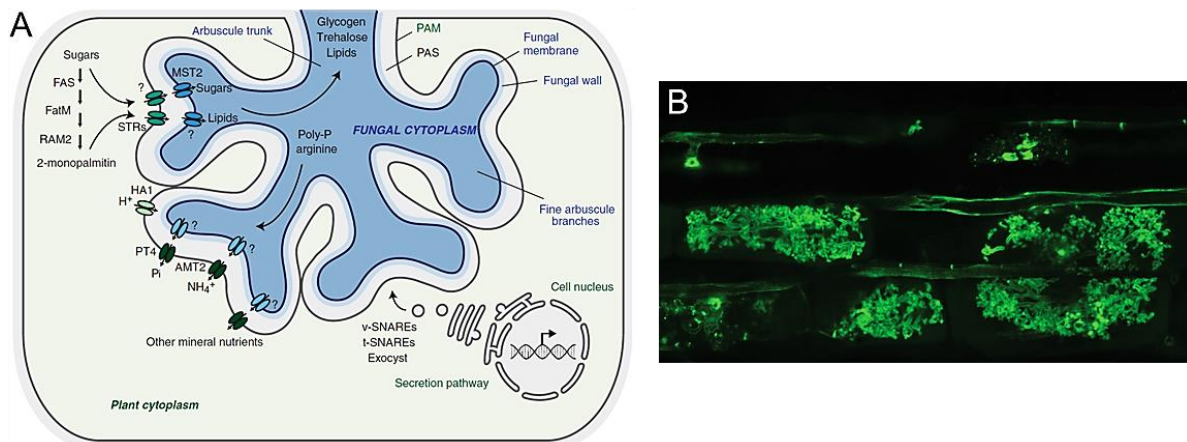


Figura 5. Estructura de los arbusculos micorrícicos. A) El arbusculo consta de un tronco y de finas ramas arbusculares. Las hifas están rodeadas por la membrana periarbuscular (PAM), que contiene bombas de protones, y transportadores de fosfato y amonio, como PT4 y AMT2; también en esta membrana se han observado varios componentes de la vía secretora. El área entre la PAM y la hifa se denomina espacio periarbuscular (PAS), aquí permanecen los nutrientes que se intercambian entre la planta y el hongo. B) Estructuras fúngicas arbusculares marcadas con el conjugado Alexa Fluor 488. Imágenes tomadas de Luginbuehl y Oldroyd (2017).

Los arbusculos experimentan una fase muy compleja de siete a ocho días de desarrollo para completar su ciclo de vida. Dentro de esos días, la etapa de actividad en el intercambio de nutrientes es muy breve (dos días) y, posteriormente, comienzan con una etapa de senescencia y degradación (Alexander *et al.*, 1989; Javot *et al.*, 2007). De tal manera, los arbusculos tienen un tiempo de vida más corta que su célula huésped; por lo que se cree que una sola célula vegetal es competente para varias rondas de invasiones sucesivas. De hecho, se ha sugerido que la vida útil de los arbusculos está influenciada en gran medida por su capacidad de proporcionar fosfato a la célula huésped. Por lo tanto, la planta mantiene arbusculos que son metabólicamente eficientes y penaliza a los no funcionales, induciendo su senescencia o degradación temprana (Javot *et al.*, 2007; Parniske, 2008).

Tráfico vesicular en la simbiosis

Durante la nodulación y la micorrización arbuscular, los microorganismos simbioses siempre se encuentran dentro de compartimentos membranales derivados de la célula vegetal (Harrison y Ivanov, 2017). Para esto, se requiere de un extenso remodelamiento del sistema de membranas que permita la formación del hilo de infección, los simbiosomas, el aparato de prepenetración y la membrana periarbuscular. El establecimiento de estas estructuras involucra la deposición polarizada de membranas, mismas que después, gracias al tráfico vesicular dirigido, desarrollan una especialización funcional para el intercambio de nutrientes (Harrison y Ivanov, 2017; Parniske, 2000).

Las plantas tienen dos clases principales de vías de tráfico membranal: 1) la vía endocítica (endocitosis), que implica el transporte de material extracelular mediado por vesículas, desde la membrana plasmática hasta un compartimento lítico y permite el reciclaje de las proteínas de la membrana plasmática; 2) la vía secretora (exocitosis), que transporta componentes recién sintetizados a la membrana plasmática o al espacio extracelular. Dentro de la vía secretora, existen tres tipos de vesículas de membrana: 1) la red trans-Golgi/endosoma temprano (TGN/EE, por sus siglas en inglés), 2) los cuerpos multivesiculares (MVB, por sus siglas en inglés) y 3) el orgánulo positivo exocisto (EXPO, por sus siglas en inglés). Mediante los dos últimos tipos de secreción se pueden liberar vesículas extracelulares (VE; Gu *et al.*, 2017). Aún se sabe muy poco sobre los mecanismos implicados en la liberación y la fusión de las VE en las células vegetales. Esto se debe a limitaciones

técnicas para la detección de dichas estructuras y a la posibilidad de que la pared celular constituya una barrera importante que impida la liberación y la toma de las vesículas por las células vegetales. A pesar de esto, se han observado VE en el apoplasto y en el espacio entre la pared celular y la membrana plasmática de las células vegetales (Keener, 2019; Rutter y Innes, 2017).

Las plantas a través de sus vesículas pueden controlar la resistencia basal al ataque de patógenos en varios niveles (Rybak y Robatzek, 2019). Por ejemplo, las vesículas vegetales, al fusionarse con la membrana plasmática pueden secretar su contenido a la pared celular o al apoplasto para suministrar compuestos antimicrobianos, proteínas de defensa o de respuesta al estrés, y pueden regular la deposición de calosa en los sitios de invasión del patógeno para formar la papila (Gu *et al.*, 2017; Nielsen *et al.*, 2012; Rutter y Innes, 2018). Además, se ha planteado que la vía secretora de las células vegetales fue aprovechada por los rizobios benéficos y los AMF como una estrategia para una invasión exitosa (Gu *et al.*, 2017). De hecho, se ha considerado que las interacciones mutualistas derivaron de una relación patogénica en una etapa de la evolución específica, en donde las plantas y los microorganismos cohabitaron proporcionándose beneficios nutricionales (Rey y Jacquet, 2018). En este sentido, es posible que todas las endosimbiosis de las plantas compartan un programa genético común para la internalización del microsimbionte, en donde múltiples vías exocíticas podrían ser necesarias y compartidas (Harrison y Ivanov, 2017; Parniske, 2000).

Actualmente, se sugiere que las membranas perifúngicas y peribacteroidales de la micorrización y de la nodulación, respectivamente, se forman a través de la exocitosis (Harrison y Ivanov, 2017). Consistente con ello, en la micorrización arbuscular se ha identificado la acumulación del retículo endoplásmico, componentes del citoesqueleto y cuerpos de Golgi alrededor de los extremos de las hifas en desarrollo, lo que podría indicar un crecimiento polarizado de la membrana perifúngica (Figura 6A; Genre *et al.*, 2012; Ivanov *et al.*, 2012; Roth *et al.*, 2019). De la misma forma, para el caso de la nodulación, se ha observado la acumulación de organelos secretores entre el hilo de infección y el núcleo que dirige su crecimiento dentro de la célula (Figura 6B; Fournier *et al.*, 2008).

Sumado a la detección de dichas estructuras, se ha encontrado la presencia de proteínas implicadas en la fusión de vesículas exocíticas (v-SNARE y t-SNARE) en las membranas de las interfaces simbióticas (Figura 6 A y B). Por ejemplo, la syntaxina de plantas

SYP132 α (t-SNARE), está presente en la membrana del hilo de infección, en la del simbiosoma y en la membrana periarbuscular (Catalano *et al.*, 2007; Huisman *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2016). De igual manera, las proteínas VAMP721d y VAMP721e (v-SNARE), se localizan en vesículas asociadas a las gotas de infección de los rizobios, a las ramas finas de los arbusculos y a la formación de la membrana periarbuscular (Gavrin *et al.*, 2016; Genre *et al.*, 2012; Ivanov *et al.*, 2012). Con estas evidencias y con la ausencia de marcadores de la vía endocítica (Rab5 y Rab7) en la membrana del simbiosoma (Limpens *et al.*, 2009), se sugiere que las membranas simbióticas se forman a través de una vía exocítica conservada que emplea a las mismas proteínas de tráfico vesicular, tanto en la micorrización arbuscular, como en la nodulación (Harrison y Ivanov, 2017; Ivanov *et al.*, 2012).

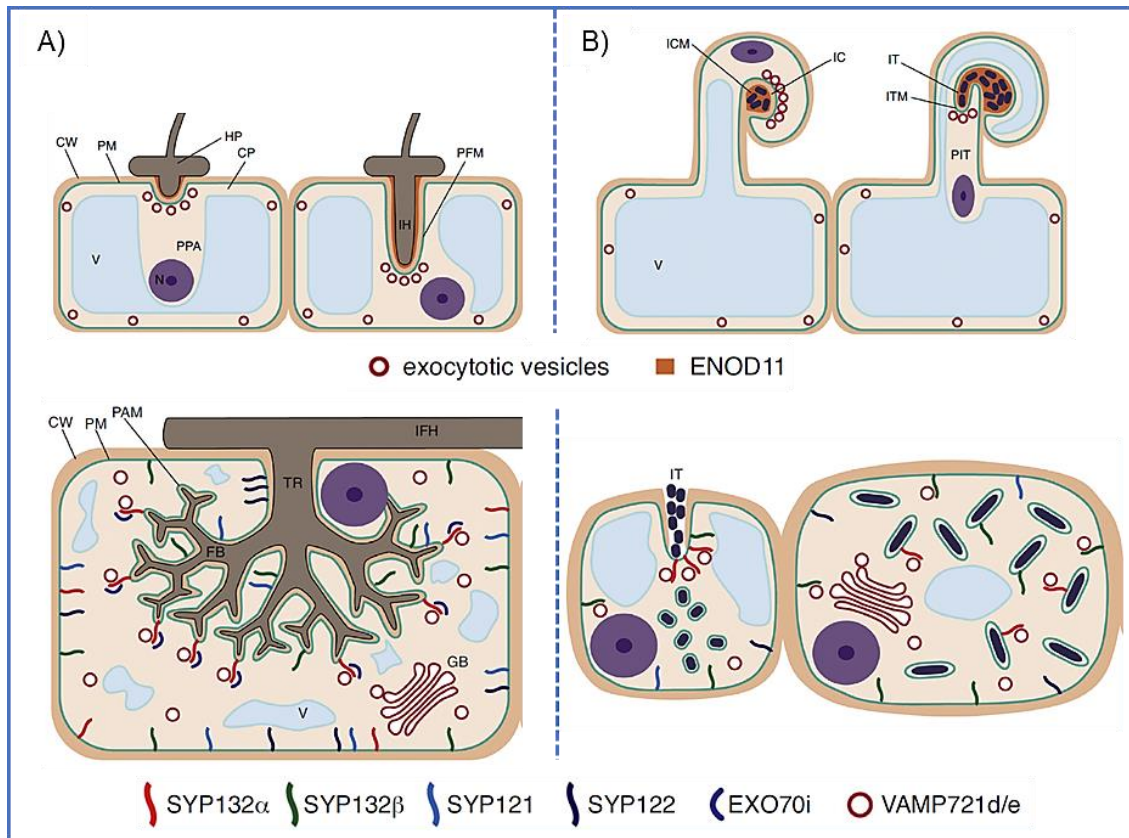


Figura 6. Esquema sobre el tráfico vesicular y las proteínas implicadas en la formación de las membranas de los compartimentos simbióticos de la micorrización (A) y de la nodulación (B). CW: pared celular; PM: membrana plasmática; CP: citoplasma; V: vacuola; N: núcleo; PPA: aparato de prepenetración; HP: hifopodio; PFM: membrana perifúngica; IH: hifa intracelular; IFH: hifa fúngica intracelular; TR: tronco de arbusculo; FB: ramas finas de arbusculos; GB: cuerpos de Golgi; IC: cámara de infección; ICM: matriz del hilo de infección; IT: hilo de infección; ITM: membrana del hilo de infección; PIT: pre-hilo de infección. Esquema modificado de Harrison y Ivanov (2017).

Exosomas y comunicación intercelular

Anteriormente, se creía que la función de las VE era mantener la homeostasis celular eliminando los productos de desechos, pero ahora se sabe que estas vesículas poseen una función en la comunicación intercelular e inter-reinos, al modular la condición fisiológica de una célula receptora cuando recibe los cargos de una célula donadora (Rybak y Robatzek, 2019). Acorde con ello, se ha demostrado que las VE como los exosomas son elementos clave para mediar la comunicación inter-reinos, entre las plantas y los microorganismos patógenos (Cai *et al.*, 2018; Hansen y Nielsen, 2018). Asimismo, se ha sugerido que este mecanismo podría favorecer a la comunicación en las interacciones mutualistas (Limpens, 2019); sin embargo, aún se sabe muy poco al respecto.

Los exosomas son una clase de VE con tamaños que van de 40 a 150 nm de diámetro que se originan de las invaginaciones de la membrana de los cuerpos multivesiculares (MVB, por sus siglas en inglés). Los MVB en plantas se consideran como endosomas tardíos que presentan tamaños de 200 a 500 nm de diámetro (Rutter y Innes, 2018). Durante el proceso de su invaginación, dentro de las vesículas se pueden reclutar diversas moléculas del citoplasma como cargo. Bajo ciertas circunstancias, los MVB se pueden fusionar con la membrana plasmática y liberar sus vesículas intraluminales en forma de exosomas al ambiente extracelular, en donde cumplen sus funciones (Gu *et al.*, 2017; Ruivo *et al.*, 2017). Los exosomas al ser compartimentos de transporte a larga distancia de proteínas, lípidos, metabolitos y ácidos nucleicos, podrían regular la expresión génica de células distantes, por lo que se han reconocido como elementos centrales en la comunicación intercelular e inter-reinos (Rutter y Innes, 2018).

Inicialmente, los exosomas se estudiaron en células animales, en donde se ha descrito su importancia biológica en la presentación de antígenos, en la modulación de la respuesta inmune y en la progresión del cáncer (Cho *et al.*, 2012; Ruivo *et al.*, 2017; Webber *et al.*, 2010). Actualmente, se ha confirmado que las células vegetales también pueden secretar exosomas y se ha observado que, al igual que en las células animales, estas vesículas contienen una amplia gama de moléculas que controlan la comunicación celular (Cai *et al.* 2019; Regente *et al.*, 2017). Los exosomas de las plantas están enriquecidos de diversas proteínas involucradas en el remodelamiento de la pared celular, proteínas de respuesta al estrés y ARNs pequeños (sRNAs) involucrados en la defensa del organismo (Baldrich *et al.*, 2019; Cai *et al.*, 2018; Nielsen *et al.*, 2012; Regente *et al.*, 2017; Rutter y

Innes, 2017). Las plantas pueden prevenir la intrusión de patógenos dirigiendo el tráfico vesicular hacia el sitio de ataque; en este sentido, se ha encontrado la acumulación de exosomas y MVB en los sitios de infección de bacterias y hongos (An *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2014). Por estas y otras razones, se ha sugerido que los exosomas de plantas contribuyen con las respuestas inmunes localizadas y con la comunicación inter-reinos (Hansen y Nielsen, 2018). Asimismo, durante la micorrización arbuscular, en el citoplasma de las células vegetales, se ha observado la fusión de MVB a la membrana periarbuscular y MVB en zonas cercanas a las hifas en crecimiento (Ivanov *et al.*, 2019; Roth *et al.*, 2019), por lo que se ha sugerido que estos compartimentos membranales podrían mediar la comunicación entre las plantas y los AMF, para mejorar o regular el establecimiento de la simbiosis (Limpens, 2019).

Por otro lado, tanto en células animales como en vegetales, los exosomas se caracterizan por tener componentes específicos. Uno de ellos son las proteínas llamadas tetraspaninas, las cuales se estima que regulan la biogénesis, el transporte, la integridad y la secreción de los exosomas (Andreu y Yáñez-Mó, 2014; Hurwitz *et al.*, 2016; Jeppesen *et al.*, 2019). En las plantas, estas proteínas también se han identificado como un elemento importante de los exosomas, sobre todo durante la infección por hongos (Cai *et al.*, 2018). Debido a que este trabajo se centra en el estudio de una de las tetraspaninas de *P. vulgaris* durante las interacciones mutualistas, en la siguiente sección se describen dichas proteínas.

Tetraspaninas

Las tetraspaninas son ubicuas en organismos eucariotas, principalmente multicelulares. Se han identificado 33 miembros de tetraspaninas en mamíferos, 37 en *Drosophila melanogaster*, 20 en *Caenorhabditis elegans* y 17 en *Arabidopsis thaliana* (Boavida *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2005; Reimann *et al.*, 2017). Las tetraspaninas son pequeñas proteínas transmembranales conformadas por 200 a 350 aminoácidos con estructuras muy conservadas. Poseen cuatro dominios transmembranales que contribuyen con la formación de dos asas extracelulares, una pequeña (SEL, por sus siglas en inglés) y una grande (LEL, por sus siglas en inglés); además, esta conformación hace que sus extremos amino y carboxilo se localicen en el lado citoplasmático (Figura 7). La LEL está formada por dos regiones, una conservada y una variable; la primera posee tres α -hélices que están involucradas en la homodimerización entre las tetraspaninas, y la segunda tiene sitios de

interacción proteína-proteína, que pueden desempeñar un papel importante en la interacción con otras proteínas (Hemler, 2003; Termini y Gillette, 2017).

En células animales, se ha descrito que la región variable de las tetraspaninas contiene de cuatro a seis cisteínas conservadas enlazadas por dos o tres puentes disulfuro; dos de estas cisteínas están contenidas en un motivo GCC conservado. En contraparte, las tetraspaninas de las células vegetales poseen nueve cisteínas conservadas en la LEL, de las cuales dos de ellas forman un motivo GCCK/RP en la región variable; además, a diferencia de las tetraspaninas de las células animales, poseen un residuo de cisteína en el asa pequeña (Boavida *et al.*, 2013; Hemler, 2003). Otra característica estructural importante de las tetraspaninas son sus modificaciones postraduccionales, como la palmitoilación y la *N*-glicosilación (Figura 7). La primera se da en los residuos de cisteínas intracelulares, influyendo en la estabilidad de la proteína y en el soporte de los complejos de tetraspaninas, mientras que la *N*-glicosilación es importante aparentemente para la función y la localización de la proteína (Boavida *et al.*, 2013; Hemler, 2003; Reimann *et al.*, 2017).

La conformación de las tetraspaninas hace posible que se asocien lateralmente de forma homotípica (entre ellas mismas) y de manera heterotípica (con otras proteínas integrales de membrana). Por esta propiedad, las tetraspaninas funcionan principalmente como organizadores dinámicos de diversas proteínas de membrana, lo que resulta en la formación de microdominios enriquecidos en tetraspaninas (TEM, por sus siglas en inglés; Hemler, 2005). Los TEM funcionan como centros de señalización móviles en las membranas, de forma similar a las balsas lipídicas; sin embargo, existen diferencias sustanciales entre ambas, por lo que se consideran como distintos tipos de microdominios que llevan a cabo sus propias funciones especializadas (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2019a; Reimann *et al.*, 2017; Termini y Gillette, 2017; Zimmerman *et al.*, 2016). Los TEM también pueden estar involucrados en muchos procesos celulares que actualmente se le atribuyen a las balsas lipídicas (Hemler, 2003, 2005).

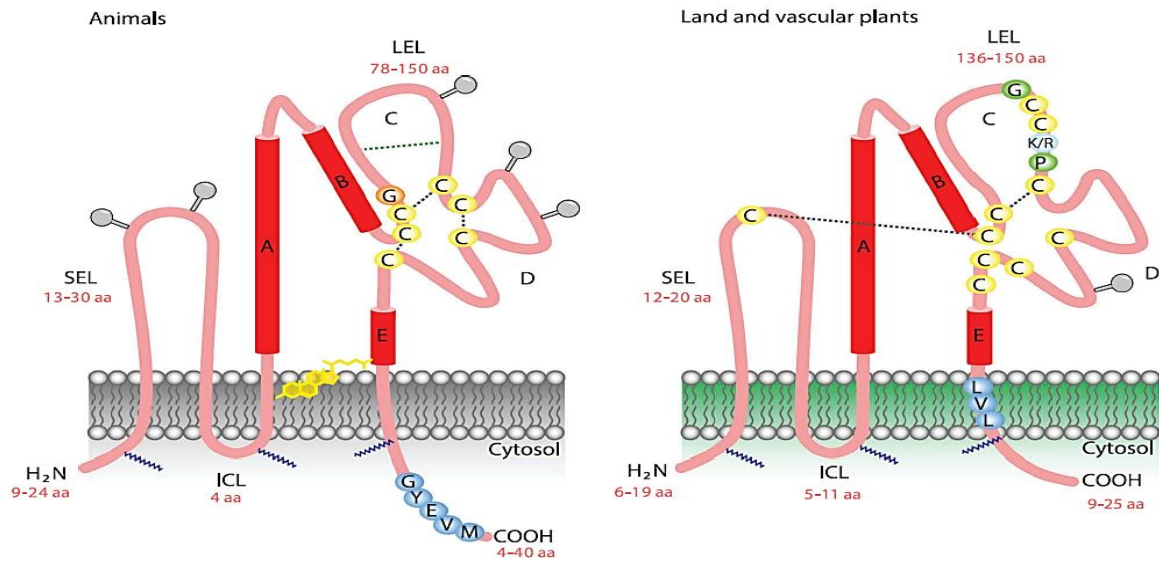


Figura 7. Estructura de las tetraspaninas en células animales y células vegetales. (LEL) asa extracelular grande; (SEL) asa extracelular pequeña; (ICL) asa intracelular; (GYEVM) péptido señal de endosoma; (GCCK/RP) secuencia conservada en plantas, (LVL) marca putativa a plasmodesmos. Tomada de Jimenez-Jimenez et al. (2019a).

Se ha mostrado que las tetraspaninas resultan ser “facilitadores moleculares” (Maecker *et al.*, 1997), ya que constituyen un centro de andamiaje y de compartimentalización membranar estable. Esta propiedad le permite a las tetraspaninas involucrarse en diversas funciones como son: la fusión y el reconocimiento de membranas, el tráfico vesicular, la organización de los endosomas, la motilidad, la proliferación, la diferenciación, la adhesión, la comunicación, la activación y la señalización celular. También parecen estar implicadas en la aceleración el desarrollo de la metástasis en condiciones patológicas (Hemler, 2003; Maecker *et al.*, 1997; Reimann *et al.*, 2017; Termini y Gillette, 2017). Debido a la relevancia de estas funciones en organismos superiores, se ha sugerido que las tetraspaninas podrían haber facilitado la multicelularidad (Huang *et al.*, 2005). En algunos casos, patógenos intracelulares como virus, bacterias, protozoarios y hongos pueden emplear a las tetraspaninas o a los TEM para interactuar con receptores o para aprovechar a las vías endo y exocíticas que favorecen la introducción y/o salida de los patógenos, para concluir con su ciclo de infección (Charrin *et al.*, 2014; Florin y Lang, 2018; Monk y Partridge, 2012). Además, la identificación de las tetraspaninas en los exosomas ha llevado a atribuirles un papel en la comunicación intercelular e inter-reinos (Cai *et al.*, 2018).

La mayoría de la información que se tiene sobre las tetraspaninas se ha descrito en células animales. Sin embargo, recientemente ha surgido interés en describir el papel de

estas proteínas en las células vegetales. Por esta razón, Wang y colaboradores (2015) caracterizaron mutantes y analizaron la actividad de los promotores de los 17 genes de tetraspaninas de *A. thaliana*, con lo que se reveló que estas proteínas están involucradas en la facilitación de la comunicación celular, en el control de la proliferación, en la diferenciación y la identidad celular, así como en la formación de tejidos. Además, con la identificación del perfil de expresión de los genes que codifican para estas proteínas en plantas, se sugiere que las tetraspaninas podrían tener funciones esenciales en el desarrollo, la fertilización y las respuestas al estrés de tipo biótico y abiótico (Mani *et al.*, 2015; Reimann *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, es difícil caracterizar el papel específico de cada tetraspanina, debido a la diversidad de sus funciones, al alto número de miembros de esta familia, y por la redundancia funcional entre ellas (Albers *et al.*, 2016; Maecker *et al.*, 1997; Reimann *et al.*, 2017).

ANTECEDENTES DIRECTOS

En *A. thaliana*, las tetraspaninas tienen un perfil de expresión espacial y temporal diferencial; algunas se expresan en dominios o tejidos específicos, tales como en los meristemas, los embriones o los tejidos reproductivos. Por ejemplo, el gen *AtTET8* se expresa en el estado embrionario globular temprano, en el dominio apical del estado embrionario de corazón y en las regiones extremas de los cotiledones del estado torpedo y del estado maduro del embrión (Wang *et al.*, 2015; Reimann *et al.*, 2017). Durante la primera etapa de la fertilización, *AtTET8* se expresa en la papila del estigma cuando el polen se adhiere, sugiriendo que *AtTET8* participa en la comunicación celular entre los gametofitos femeninos y masculinos (Boavida *et al.*, 2013). Asimismo, *AtTET8* se acumula preferentemente en la membrana de la región apical del tubo polínico en crecimiento, durante su trayecto a través del tracto de transmisión, por lo que se le ha relacionado con el crecimiento polar y con los procesos de exocitosis que regulan la intensa comunicación con el tracto reproductivo femenino (Boavida *et al.*, 2013; Reimann *et al.*, 2017). Este proceso, es muy similar al crecimiento polarizado que tiene el hilo de infección en la nodulación; en ambos se requiere de una activa participación de la maquinaria exocítica, así que es posible que alguna de las tetraspaninas también regule la migración del hilo de infección.

Por otro lado, se sugiere que *AtTET8* tiene un papel funcional en la respuesta de defensa de las plantas (Wang *et al.*, 2015). En este sentido, se observó que de las 17

tetraspaninas de *A. thaliana*, únicamente AtTET8 y AtTET9 se presentaron en la formación de exosomas, los cuales se reconocieron como elementos clave para contender con la infección por el hongo patógeno *Botrytis cinerea* (Cai *et al.*, 2018). Resulta interesante que AtTET8 es estructuralmente similar a la tetraspanina CD63 de células animales, la cual es el marcador específico de exosomas en mamíferos. De esta manera, las VE derivadas de MVB y marcadas con TET8 pueden ser consideradas como verdaderos exosomas de plantas (Cai *et al.*, 2018). Además, en esta investigación se mostró que los exosomas marcados con la proteína de fusión AtTET8:GFP estaban cargados con sRNAs, se acumulaban en los sitios de infección y, al fusionarse con la membrana de los hongos, liberaban su contenido al citoplasma del patógeno, atenuando la expresión de genes de virulencia. De esta manera, se demostró que existe una comunicación inter-reinos entre plantas y microorganismos mediada por exosomas, en donde las tetraspaninas resultan ser indispensables (Cai *et al.*, 2018).

Por otra parte, Jimenez-Jimenez y colaboradores (2019b) identificaron los perfiles de expresión de los genes de las tetraspaninas de *P. vulgaris*. En el estudio, se encontró que las tetraspaninas se expresan durante el desarrollo de la raíz y en el proceso de la nodulación. En este trabajo se mostró que los genes de *PvTET1* y *PvTET3* se expresan mayoritariamente en las células de la raíz y en los nódulos; sin embargo, *PvTET8* parece expresarse preferencialmente en el establecimiento de la nodulación. En este sentido, el promotor de *PvTET8* mostró actividad a partir de las primeras etapas de la simbiosis, es decir, durante la deformación del pelo radical, la formación del hilo de infección y el desarrollo del primordio del nódulo en las células del córtex externo. Además, el transcrito de *PvTET8* aumentó significativamente a partir de los 14 días después de la inoculación con *Rhizobium tropici* (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2019b).

El perfil de expresión del gen *PvTET8*, parece sugerir que esta tetraspanina tiene un papel importante desde las primeras etapas de la nodulación, particularmente en la división celular, en la regulación del tráfico vesicular (exosomas) y/o en la fusión de membranas. En este sentido, como la nodulación y la micorrización requieren de un constante intercambio de señales, es posible que la secreción de exosomas pudiera ser un elemento importante para la comunicación y/o el desarrollo de los microsimbiontes, como ocurre en la patogénesis. Esto tiene un sustento importante si se considera que los rizobios y los AMF comparten mecanismos de infección similares a los patógenos, y pareciera que las plantas emplean

algunos genes, respuestas inmunes o componentes moleculares comunes para controlar tanto a organismos benéficos como a organismos patógenos (Mithöfer, 2002; Rey y Jacquet, 2018).

Debido a la participación de las tetraspaninas en el tráfico vesicular, en la fusión de las membranas y en la formación de los exosomas, en este trabajo se determinó mediante el silenciamiento y la sobreexpresión de *PvTET8*, si el producto de este gen regula el establecimiento de las interacciones mutualistas y si su localización subcelular se organiza en forma de vesículas. Además, se determinó si su promotor es activo durante el desarrollo de la micorrización. Este estudio permitió generar información básica, que eventualmente proporcionará un mejor entendimiento de la comunicación celular que necesitan establecer las plantas con diferentes organismos para que ocurran interacciones mutualistas como la nodulación y la micorrización.

HIPÓTESIS

La tetraspanina *PvTET8* tiene un papel positivo en la comunicación entre las plantas y los microsimbiontes, por lo que las alteraciones de los niveles de expresión del gen *PvTET8* afectan los procesos de infección de *P. Vulgaris* con *R. tropici* y *Rhizophagus irregularis*.

OBJETIVOS

General

Determinar el papel funcional de *PvTET8* en los procesos de nodulación y micorrización arbuscular en *P. vulgaris*.

Particulares

- ❖ Establecer la localización subcelular de la proteína de fusión *PvTET8:GFP*.
- ❖ Determinar la actividad del promotor del gen *PvTET8* en *P. vulgaris* en respuesta a la colonización micorrícica.
- ❖ Evaluar los efectos de la sobreexpresión y el silenciamiento del gen *PvTET8* en raíces de *P. vulgaris* sobre las eficiencias de nodulación y micorrización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema metodológico

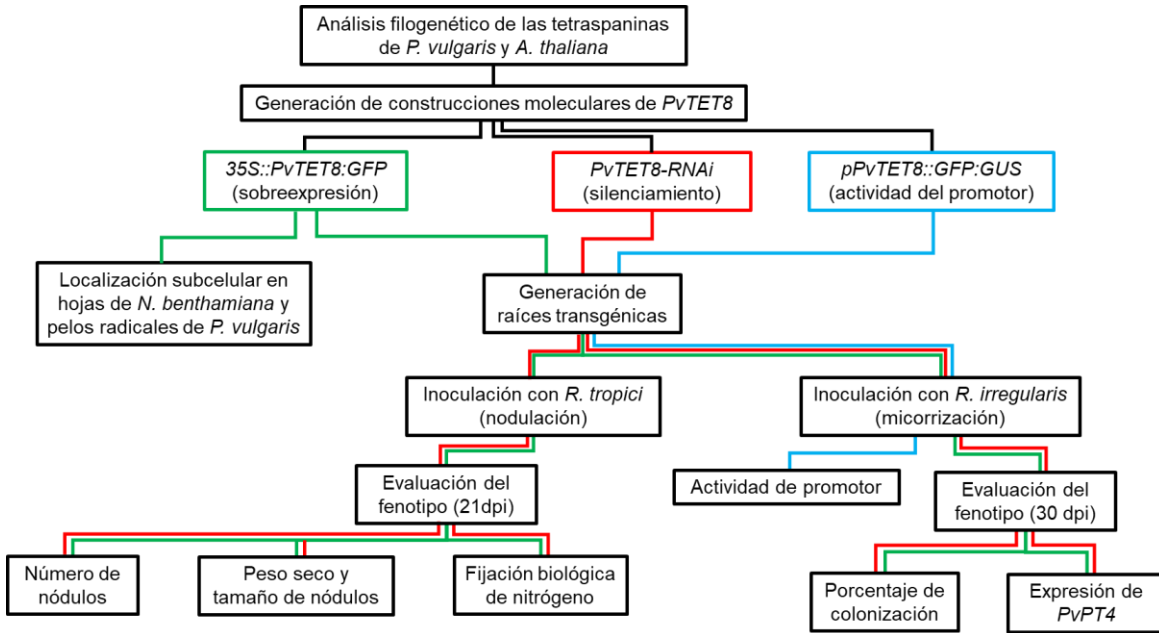


Figura 8. Diseño experimental. Las líneas verdes corresponden a los experimentos realizados con la construcción de sobreexpresión del gen *PvTET8*. Las líneas rojas indican los experimentos desarrollados con la construcción de silenciamiento del gen *PvTET8*. Las líneas azules corresponden a los ensayos realizados con la construcción molecular previamente diseñada por Jimenez-Jimenez et al. (2019b).

Análisis bioinformático

Las secuencias de aminoácidos de las tetraspaninas de *A. thaliana* y de *P. vulgaris* se obtuvieron de la base de datos Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>; Goodstein et al., 2012). Con estas secuencias se realizó un alineamiento múltiple con el programa MUSCLE 3.8.31 (<https://www.drive5.com/muscle/>; Edgar, 2004), y después con MEGA-X (<https://www.megasoftware.net/>; Kumar et al., 2018) se construyó un árbol filogenético empleando el método de máxima verosimilitud con 1000 bootstraps.

Adicionalmente, mediante un análisis *in silico* se identificaron elementos de regulación en *cis* en el promotor (1000 pares de bases) del gen Phvul.003G151800.1 (*PvTET8*) potencialmente relacionados con la nodulación y la micorrización. Para este análisis se emplearon las bases de datos Phytozome y New PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>; Higo et al. 1999).

Construcciones moleculares

Para evaluar la actividad del promotor del gen *PvTET8* bajo condiciones de micorrización, se utilizó la construcción molecular *pPvTET8::GFP:GUS*, previamente diseñada y construida en por Jimenez-Jimenez *et al.* (2019b). En este vector se tienen fusionados como reporteros a los genes de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) y de la enzima β -glucuronidasa (GUS), bajo el control de un fragmento de 1000 pb corriente arriba del codón de iniciación del gen *PvTET8*.

Para la sobreexpresión del gen *PvTET8*, se generó la fusión traduccional *35S::PvTET8:GFP* mediante el sistema de clonación GATEWAY. Para esto, mediante una PCR obtenida a partir de ADN complementario (cDNA) e iniciadores específicos (Tabla 1), se amplificó la secuencia codificante (CDS, por sus siglas en inglés) del gen *PvTET8* (Tabla 2). El producto de PCR se purificó con el kit de extracción de gel GeneJET (Thermo Scientific™) y se clonó en el vector de entrada *pENTR/D-TOPO* (Invitrogen) mediante la transformación de bacterias quimio-competentes de *Escherichia coli* TOP10, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen. Life Technologies Corporation, 2012). Las colonias transformantes se seleccionaron por la resistencia al antibiótico kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) conferida por el plásmido, y la inserción del fragmento se verificó mediante PCR y secuenciación. Este vector de entrada se recombinó con el vector destino *pH7FWG2* (Karimi *et al.*, 2002) para fusionar al extremo 5' de la secuencia codificante con el promotor de expresión constitutiva 35SCamV (35S), y a su extremo 3' con la región codificante del gen *GFP* (Figura 9). Con esta construcción se transformaron bacterias TOP10, que se seleccionaron por la resistencia al antibiótico espectinomicina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finalmente, la construcción molecular se verificó mediante PCR y secuenciación. Como control se usó el vector destino *pH7FWG2* no modificado.

Para el silenciamiento del gen *PvTET8*, se diseñó un ARN interferente (RNAi) basado en un fragmento de 231 pb de la región 5' no traducida (5'-UTR, por sus siglas en inglés) del gen *PvTET8*. Dicho fragmento se amplificó por PCR (Tabla 2) a partir de cDNA y oligonucleótidos flanqueantes específicos (Tabla 1). El producto de PCR se insertó en el vector de entrada *pENTR/D-TOPO* (Invitrogen), el cual se utilizó para recombinarlo con el vector destino *pTDT-RNAi* (Figura 10; Valdés-López *et al.*, 2008). El vector *pTDT-RNAi* posee la secuencia del gen *tdTomato* que codifica para una proteína roja fluorescente, que sirve como proteína reportera para identificar a las raíces transgénicas. La clonación con el

sistema GATEWAY se realizó de la misma forma descrita para la sobreexpresión del gen *PvTET8*. Como control, en el vector *pTDT-RNAi* se incluyó una secuencia truncada e infuncional del *pre-mir159* de *A. thaliana*, cuya secuencia blanco no está presente en el genoma de *P. vulgaris* (Montiel *et al.*, 2012).

Los plásmidos con las construcciones moleculares de sobreexpresión y silenciamiento fueron purificados por el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) y se emplearon individualmente para transformar a la cepa *K599* de *Agrobacterium rhizogenes*, con las que se generaron raíces transgénicas (raíces pilosas) en *P. vulgaris*. Además, con la construcción *35S::PvTET8:GFP* se transformó a la cepa *CV3010* de *Agrobacterium tumefaciens* para determinar la localización subcelular de *PvTET8* en hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante el sistema de expresión transitoria (Norkunas *et al.*, 2018).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la generación de las construcciones moleculares

Iniciadores empleados para amplificar la CDS de <i>PvTET8</i> (sobreexpresión)	
<i>Forward: FwCDSTET8</i>	5' CACCATGGTTCGCTTCAG 3'
<i>Reverse: RvCDSTET8</i>	5' ATATCTCTTCCAATTCTCCTGCC 3'
Iniciadores usados para amplificar el ARN interferente de la región 5'UTR de <i>PvTET8</i> (silenciamiento)	
<i>Forward: FwRNAiTET8</i>	5' CACCTGCAATAAGATCCCGAA 3'
<i>Reverse: RvRNAiTET8</i>	5' GATTGAGAGGAGGAAGGTGAG 3'

Tabla 2. Programas de amplificación para los fragmentos *CDSTET8* y *RNAiTET8* utilizando la enzima DNA polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific)

Fragmento	No. de ciclos	Temperatura/ tiempo de desnaturalización	Temperatura/ tiempo de alineamiento	Temperatura/ tiempo de extensión
<i>CDSTET8</i>	30	98 °C/ 30 s	62 °C/ 30 s	72 °C/ 30 s
<i>RNAiTET8</i>	30	98 °C/ 30 s	62 °C/ 30 s	72 °C/ 8 s

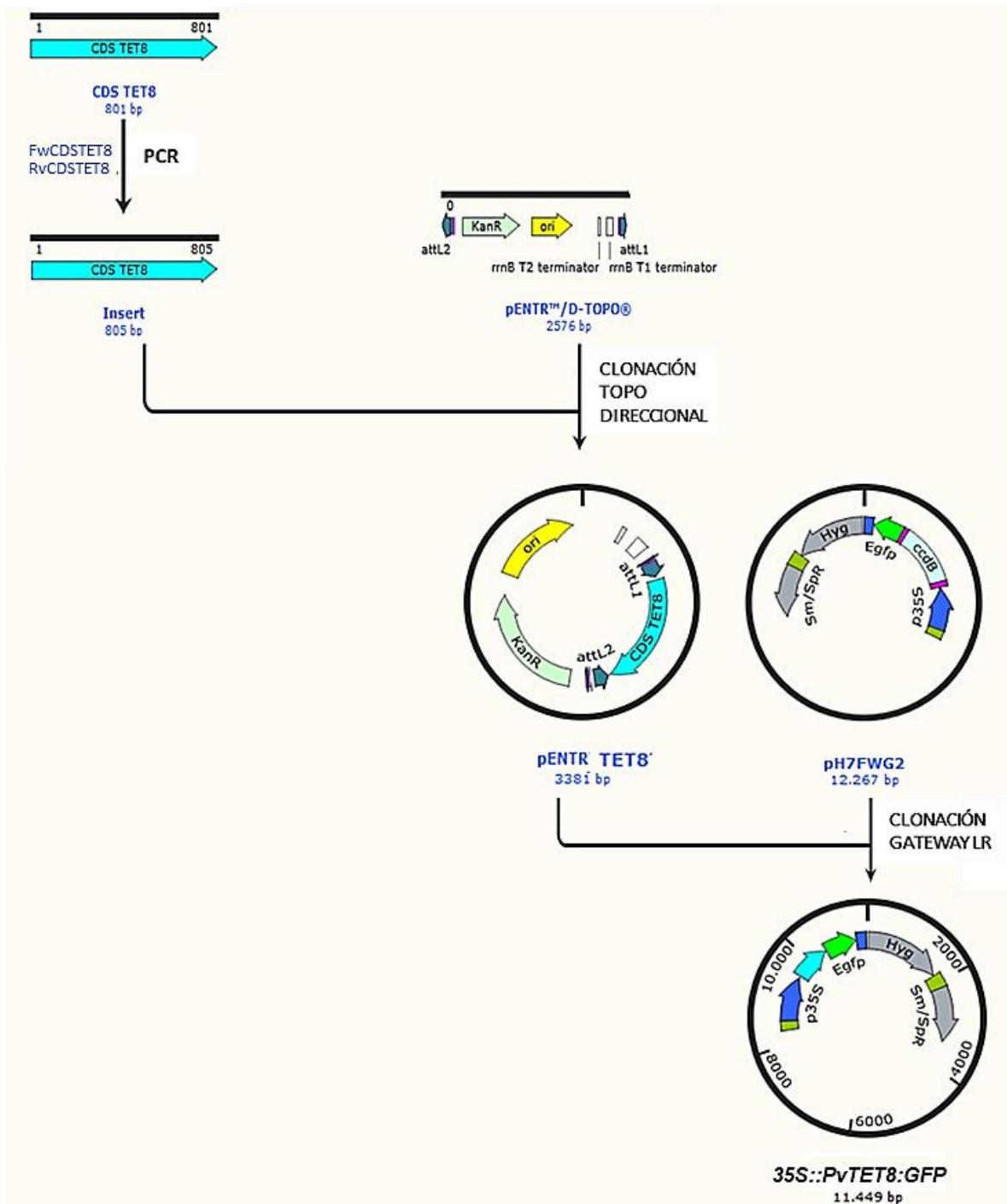


Figura 9. Esquema experimental de la generación de la construcción molecular para la sobreexpresión del gen *PvTET8* usando el sistema de clonación GATEWAY. Esquema realizado con el programa de SnapGene 5.3.

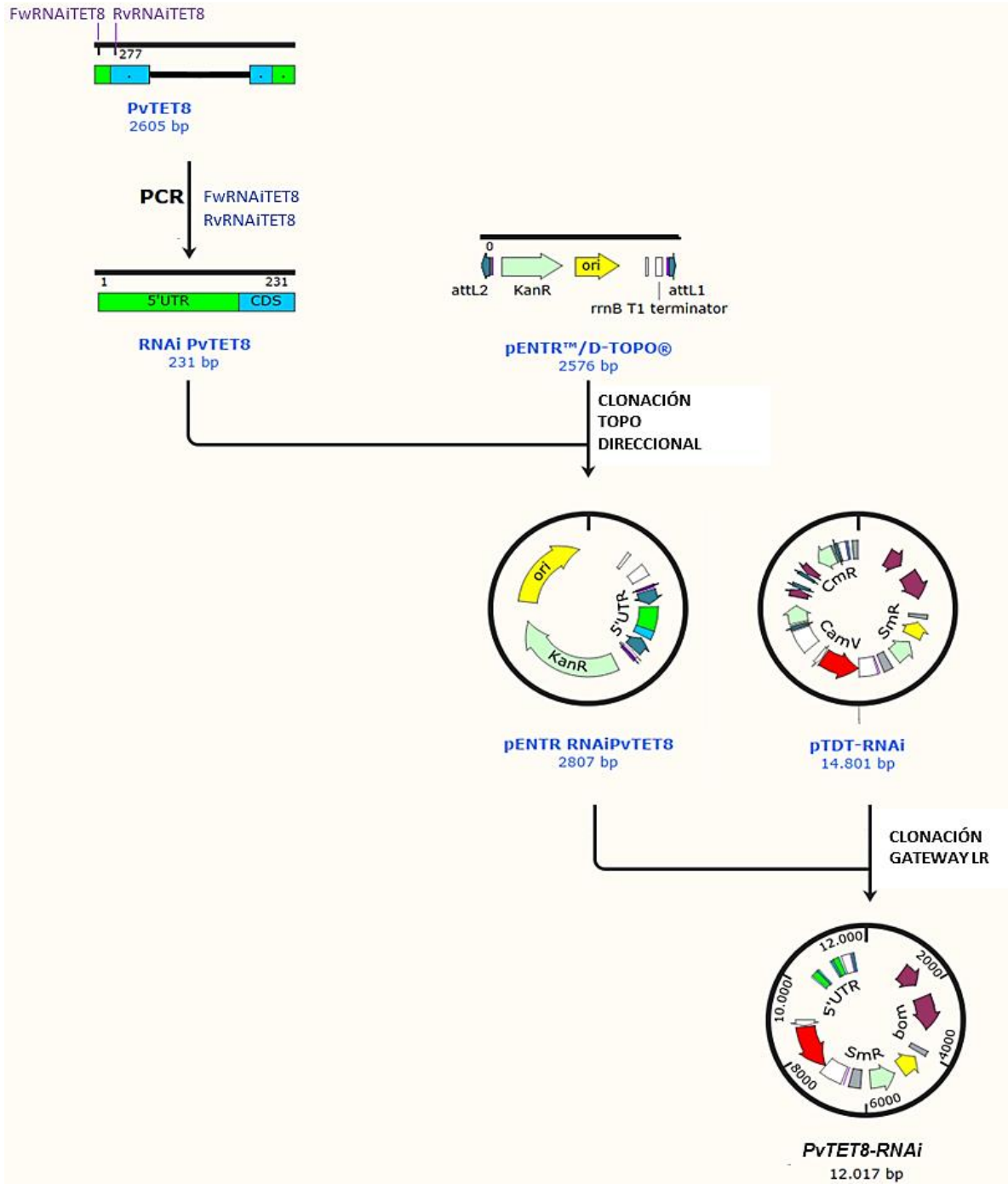


Figura 10. Esquema experimental de la generación de la construcción molecular para el silenciamiento del gen *PvTET8* usando el sistema de clonación GATEWAY. Esquema realizado con el programa de SnapGene 5.3.

Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de *P. vulgaris* cv. *Negro Jamapa* se lavaron con agua estéril en la campana de flujo laminar, se desinfectaron durante cinco minutos con una solución al 1% de hipoclorito de sodio y se enjuagaron con agua estéril. En seguida se mantuvieron en alcohol etílico industrial al 96% durante un minuto, se lavaron nuevamente con agua estéril y se dejaron secar. Para su germinación, las semillas desinfectadas se colocaron en charolas metálicas con papel absorbente previamente esterilizado y humedecido con medio Fahraeus estéril (CaCl₂ 680 µM, MgSO₄ 486 µM, KH₂PO₄ 734 µM, Na₂HPO₄ 1042 µM, citrato férrico 18.5 µM, MnSO₄ 12 µM, ZnSO₄ 765.1 µM, H₃BO₃ 46.25 µM, CuSO₄ 320 µM, H₂MoO₄ 38.8 µM; Fahraeus, 1957). Posteriormente, se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 48 horas (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007).

Plantas compuestas

Las plantas compuestas se caracterizan por estar constituidas por una parte aérea (tallo y hojas) de tipo silvestre y raíces transformadas genéticamente (raíces pilosas; Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). Para generar este tipo de plantas, a las semillas germinadas de aproximadamente 48 horas, se les realizó una herida en la radícula en la zona más cercana a los cotiledones donde se les infectó con *A. rhizogenes* transformada con la construcción deseada. Las plántulas infectadas se colocaron dentro de un sistema de tubos de vidrio y tubos cónicos de 15 mL con medio Fahraeus, y se incubaron a 28°C con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Las raíces transgénicas se generaron en aproximadamente 11 días después de la infección, momento en el que se cortó el sistema radicular principal (no transformado) con la finalidad de favorecer el crecimiento de las raíces pilosas (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). Finalmente, la recuperación de raíces transgénicas se confirmó través de la fluorescencia conferida por las construcciones moleculares (GFP para la sobreexpresión y la actividad del promotor, y tdTomato para el silenciamiento).

Localización subcelular de PvTET8 en *Nicotiana benthamiana* y *P. vulgaris*

Las semillas de *N. benthamiana* se desinfectaron en la campana de flujo laminar con una solución al 1% de hipoclorito de sodio y Tritón X-100 al 0.002% durante 5 min; se lavaron con agua estéril varias veces y se dejaron secar. Las semillas se almacenaron en oscuridad a 4 °C al menos 24 horas antes de su uso. Posteriormente, se sembraron en macetas con

Metromix esterilizado y se regaron cada tres días con agua estéril. La agroinfiltración se realizó en hojas de plantas de cinco a seis semanas de edad. Esta ventana de tiempo determina la eficiencia de la transformación (Norkunas *et al.*, 2018).

Para la agroinfiltración, se utilizó un cultivo de la cepa CV3010 de *A. tumefaciens* previamente transformada con el vector *35S::PvTET8:GFP* que fue crecida en medio Luria-Bertani (LB; BD Difco™) suplementado con espectinomicina (250 µg/mL), rifampicina (50 µg/mL), gentamicina (10 µg/mL) y acetosiringona 20 µM (Sigma-Aldrich); el cultivo se creció en agitación a 28 °C durante 12 horas. Posteriormente, se centrifugó 5 min a 14000 g, el paquete celular se resuspendió en un mililitro de amortiguador de infiltración (Na₂HPO₄ 2mM, MES 50 mM pH 5.6, acetosiringona 100 µM y sacarosa a 5 mg/mL), y se realizó una dilución a una OD₆₀₀=1 en el mismo amortiguador de infiltración (Li, 2011; Norkunas *et al.*, 2018). Una vez preparada, la suspensión celular se dejó reposar de dos a cuatro horas a temperatura ambiente antes de su uso. Las hojas verdaderas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron por el envés de las hojas con una jeringa de 1 mL sin aguja (Norkunas *et al.*, 2018). 72 horas después de la agroinfiltración, las zonas transformadas se observaron en un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti-E (Software Slidebook) con una lente de inmersión en agua 40x/1.25 NA y un láser de argón a una longitud de excitación de 488 nm y un filtro de emisión de 500 a 530 nm.

Para la localización subcelular de PvTET8 en *P. vulgaris*, se generaron raíces transgénicas a través del método ya descrito. Las raíces pilosas se formaron después de una infección con una clona de *A. rhizogenes* portadora de la construcción molecular *35S::PvTET8:GFP*, y la localización de PvTET8 se analizó en los pelos radicales de raíces pilosas de cuatro días de edad bajo un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti-E en las condiciones descritas.

Inoculación de las plantas compuestas con *Rhizobium tropici*

Para los experimentos de nodulación, las plantas compuestas de frijol se sembraron en macetas con vermiculita estéril y se inocularon con 1 mL de una suspensión celular de las cepas *CIAT899/WT*, *CIAT899/DsRed* o *CIAT899/GFP* de *R. tropici* a una OD₆₀₀=0.05. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 28 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad), regándose dos veces a la semana con 30 mL de medio Fahraeus sin nitrógeno, con la finalidad de inducir la nodulación. 21 días después de la inoculación (dpi)

se determinó el número de nódulos por planta, el peso seco, el tamaño y la actividad de la nitrogenasa de los nódulos; además, se midieron los parámetros de crecimiento de las plantas, como la longitud del tallo, el peso seco de las hojas y el peso seco de las raíces.

Ensayo de reducción de acetileno

La actividad de la nitrogenasa en los nódulos se determinó indirectamente a través de la medición de la reducción de acetileno en nódulos de 21 dpi. Para esto, las raíces noduladas se colocaron en pequeños frascos de vidrio con tapones de hule, a los cuales se les inyectó 2 mL de gas acetileno. Las muestras se incubaron al menos 60 min a temperatura ambiente, para posteriormente cuantificar la concentración de etileno mediante cromatografía de gases (Variant modelo 3300; Ramírez *et al.*, 1999). La actividad específica se expresa como μmol de etileno g^{-1} del peso seco de los nódulos (PSN) h^{-1} .

Inoculación de las plantas compuestas con *Rhizophagus irregularis*

Para los experimentos de micorrización se utilizaron esporas de *R. irregularis*, proporcionadas por la Dra. Dora Trejo Aguilar de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana, Veracruz, México. Las raíces de las plantas compuestas se inocularon con 140 esporas de *R. irregularis* (M+) distribuidas homogéneamente en el sustrato, y los controles fueron plantas no inoculadas (M-). Las plantas M+ y M- se mantuvieron en macetas con vermiculita estéril y se regaron con una solución Hoagland estéril con el pH ajustado a 6.1 y una baja concentración de fosfato (10 μM) para inducir la colonización micorrícica (Ca $[\text{NO}_3]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM, KNO_3 2.5 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, NaFe EDTA 50 μM , KH_2PO_4 10 μM , H_3BO_3 10 μM , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 μM , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 μM , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 μM , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 μM , HCl 25 μM , MES 0.5 mM; Hoagland y Arnon, 1950). Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 28 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) durante 30 días. Las raíces transformadas con la construcción *pPVTE8::GFP::GUS* se analizaron por tinción histoquímica para revelar la actividad de GUS y, por lo tanto, del promotor de *PvTE8*. En los experimentos de sobreexpresión y silenciamiento se midieron los parámetros de crecimiento de las plantas, y se colectaron las raíces para determinar la colonización micorrícica, el peso seco de la raíz, y la acumulación del transcrito de algunos genes.

Tinción histoquímica para la β -glucuronidasa

Para determinar la actividad de la β -glucuronidasa (GUS) bajo el control del promotor de *PvTET8*, las muestras de las raíces colonizadas por *R. irregularis* se analizaron histoquímicamente de acuerdo al método de Jefferson (1987). Las raíces previamente limpias se trataron durante cinco minutos a temperatura ambiente con la "Solución de lavado 1" (Na_2HPO_4 50 mM pH 7.2, NaH_2PO_4 15 mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.5 mM y $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.5 mM). Después, se colocaron durante cinco minutos en la "Solución de lavado 2" (Solución de lavado 1 con EDTA 2 mM pH 8 y Tritón X 100 al 0.1%). La actividad de GUS se reveló con la "Solución de tinción GUS" (Solución de lavado 2 con X-Gluc 2 mM). Una vez que las raíces se trataron con la última solución, se lavaron con agua estéril para detener la reacción y se desgasificaron en un sistema de trampa de agua. Inmediatamente después, el tejido de la raíz se clarificó con una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% durante aproximadamente 16 horas y se lavaron con agua estéril. Se evaluaron las raíces de 20 plantas y se obtuvieron imágenes de campo claro con aumento de 56x en un estereoscopio (Olympus SZX7) acoplado a una cámara Olympus (DP74).

Marcaje de micorrizas con WGA-Alexa Fluor 488

A las raíces inoculadas con *R. irregularis* (30 dpi) se les trató durante un día con un buffer de fijación (PME 5X pH 6.9 [PIPES 100 mM, MgSO_4 10 mM, EGTA, 20 mM], formaldehído y DMSO) y se realizaron lavados con agua estéril. Posteriormente, el tejido se sumergió en una solución de KOH al 20% durante cuatro días a temperatura ambiente. Para remover el KOH, el tejido se mantuvo en agua destilada por 12 horas y se realizaron lavados en los dos días siguientes. Las muestras se mantuvieron durante una hora en una solución amortiguadora de fosfato salina (PBS, por sus siglas en inglés; 1X) y después se les agregó una solución de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 488 conjugate (WGA-Alexa Fluor 488; Molecular Probes, Invitrogen) en PBS (Javot *et al.*, 2007). La aglutinina del germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés) es una lectina que se une selectivamente a residuos de *N*-acetilglucosamina (componente principal de la quitina de la pared celular de los hongos) y al ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico), por lo que el conjugado WGA-Alexa Fluor 488 permite visualizar a las estructuras fúngicas por fluorescencia (Javot *et al.*, 2007). Esta técnica permitió comparar la presencia de los arbusculos con los sitios de actividad del promotor de *PvTET8* y analizar el fenotipo de la colonización micorrícica en *P.*

vulgaris de raíces transformadas con las construcciones de sobreexpresión y silenciamiento. Para cada planta se evaluaron 30 segmentos de raíces colonizadas por *R. irregularis*. Los segmentos de raíz marcados con WGA-Alexa Fluor 488 se analizaron utilizando microscopía confocal de barrido láser (Nikon Eclipse Ti-E), a longitudes de onda de excitación y emisión para el fluoróforo de 488 y 550 nm, respectivamente.

Tinción y cuantificación de la colonización micorrícica

Para evaluar el porcentaje de colonización micorrícica y el desarrollo de las estructuras simbióticas, las raíces inoculadas con *R. irregularis* se tiñeron con azul de tripano. Este método consistió en fijar a las raíces durante 24 horas en etanol al 50%, lavados con agua destilada y tratamientos con una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 20% a temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, las raíces se lavaron con agua destilada y se trataron con una solución al 10% de ácido clorhídrico (HCl) durante 24 horas. Después de retirar el HCl y sin lavarse las raíces, se tiñeron con una solución 0.03% de azul de tripano durante tres días (Koske y Gemma, 1989). Las muestras se lavaron con agua destilada y se destiñeron durante 24 horas con una solución de lactoglicerol (ácido láctico, glicerol y agua destilada en una relación 1:1:1).

Los segmentos de raíces teñidas se observaron en un microscopio invertido (Nikon TE300) con las magnificaciones de 10 y 40X. La colonización micorrícica total (hifas, vesículas, arbuscúlos y apresorios) se calculó siguiendo el método de la intersección en la línea descrito por Giovannetti y Mosse (1980). La determinación del porcentaje de colonización arbuscular se calculó utilizando el software de análisis Mycocalc (<https://www2.dijon.inrae.fr/mychintec/Mycocalcprg/download.html>), basado en el método de Trouvelot *et al.* (1986; Figura 11). El número de sitios de infección, apresorios, vesículas y arbuscúlos a lo largo de la longitud de cada raíz, se determinó mediante un análisis de imágenes utilizando el software ImageJ (versión 1.8.0_112; Javot *et al.*, 2011). Por cada planta analizada, se evaluaron 30 segmentos de raíces colonizadas por *R. irregularis*.

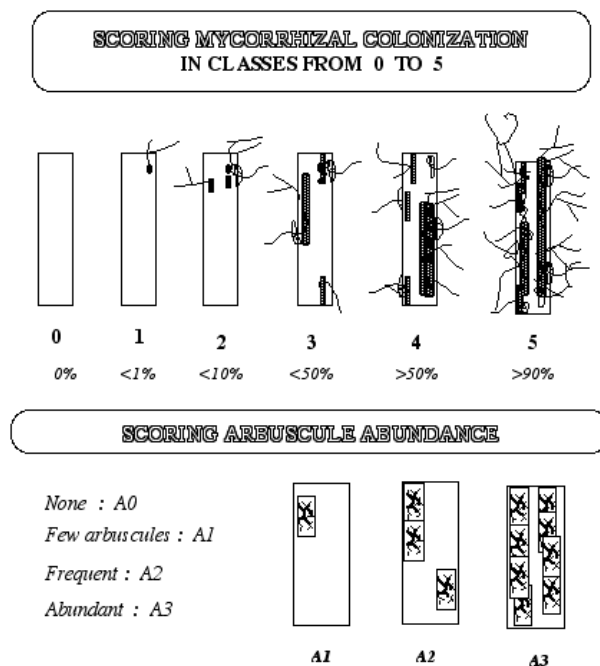


Figura 11. Esquema de los niveles de colonización micorrícica. Tomada de Trouvelot et al. (1986).

Análisis de expresión de genes

El ARN total se extrajo a partir de tejido congelado de raíces transgénicas. Las extracciones se realizaron siguiendo el método del TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, EU), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La integridad del ARN se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa. Las concentraciones y las purezas de ARN se evaluaron a partir de las relaciones de absorbancia de A260/280 y A260/230, usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific; EU). Las síntesis de cDNA se realizaron a partir de 200 ng de ARN usando la enzima Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, EU).

Las reacciones de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) se prepararon con 200 ng de cDNA como templado, usando la Master Mix qPCR Maxima SYBR Green/ROX (Thermo Fisher) y el instrumento QuantStudio™ 5 System. Los oligonucleótidos empleados en las reacciones se muestran en la Tabla 3. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 95 °C durante 10 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s y una etapa de alineamiento de 60 °C por 1 min. El nivel de expresión relativa se determinó por el método $2^{-\Delta CT}$ descrito por Schmittgen y Livak (2008), utilizando al Factor de Elongación 1 α (EF1 α) de *P. vulgaris* como gen de referencia (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en el qRT-PCR.

Oligonucleótidos empleados para los RT-PCR cuantitativos		
Gen	Forward	Reverse
<i>PvTET8</i>	5' GTCTCTCTAGCCGGCCTCAT 3'	5' TGACAACGAAGGCGAAGATGG 3'
<i>PvEF1α</i>	5' GGTCATTGGTCATGTCTGACTCTGG 3'	5' GCACCCAGGCATACTTGAATGACC 3'
<i>PvPT4</i>	5' GCGGTGACTAACATGTTAGGG 3'	5' CCTGTGCCCTAGTATTGTTGG 3'

Detección de superóxido mediante la tinción de NBT

La producción de superóxido en las raíces transgénicas *35S::PvTET8:GFP* y *PvTET8-RNAi*, se determinó mediante la tinción con nitroazul de tetrazolio (NBT; C₄₀H₃₀Cl₂N₁₀O₆). Para este ensayo se emplearon raíces de 15 días de edad crecidas en tubos de vidrio con medio Fahraeus sin nitrógeno, a las cuales se les trató con una solución 0.1% de NBT diluido en un amortiguador de fosfato de sodio (NaH₂PO₄; 50mM, pH 7.5). Las raíces se dejaron incubar en dicha solución en oscuridad y a temperatura ambiente durante una hora. Cuando el precipitado de formazan (producido por la reacción de NBT con el anión superóxido) fue visible, se prosiguió a desteñir las raíces con alcohol etílico al 96% durante una hora y con alcohol etílico al 40, 20 y 10% durante 25 min cada uno (Grellet y Díaz-Ricci, 2011). Finalmente, las raíces se colocaron en una solución de glicerol al 50% y las imágenes se capturaron inmediatamente en un estereoscopio Olympus SZX7 con cámara Olympus DP74.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados para obtener las medidas de tendencia central, como la media y la desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés). Antes del análisis estadístico se verificó que los datos utilizados presentaran distribuciones normales con una prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965). Posteriormente, las diferencias significativas se determinaron a través de un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés; Fisher, 1925; Kaufmann y Schering, 2014) de una vía, seguida de una prueba de Tukey (Tukey, 1949). Los asteriscos simples, dobles o triples en las columnas indican diferencias que son estadísticamente significativas a $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ y $P \leq 0,001$, respectivamente. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism (versión 6.00) para Windows.

RESULTADOS

Las TETRASPANINAS 7 y 8 de *P. vulgaris* se agrupan filogenéticamente con las TETRASPANINAS 7, 8 y 9 de *A. thaliana*

Los antecedentes sugieren que en *A. thaliana*, la tetraspanina AtTET8 regula la invasión de *B. cinerea* mediante la formación de exosomas. Por otro lado, en *P. vulgaris* la expresión de algunos genes de tetraspaninas podrían requerirse para el desarrollo de la nodulación, en donde *PvTET8* sobresale como un candidato importante debido a que es muy activo en el desarrollo del nódulo (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2019b). Por esta razón, en primera instancia se construyó un árbol filogenético con las secuencias de aminoácidos de las tetraspaninas de *A. thaliana* y de *P. vulgaris* con la finalidad de determinar las relaciones monofiléticas de *PvTET8* con el resto de las tetraspaninas de frijol y encontrar sus ortólogos en *A. thaliana*. En la Figura 12A se observa que la tetraspanina *PvTET8* está estrechamente relacionada con *PvTET7* y éstas a su vez comparten un mismo clado con AtTET7, AtTET8 y AtTET9 (Figura 12A, ver recuadro rosa), que como ya se mencionó tienen una relevancia particular, ya que en *Arabidopsis* han sido descritas como componentes de los exosomas y, por lo tanto, constituyen genes de interés para este trabajo. Asimismo, se analizaron las estructuras de los genes para las tetraspaninas pertenecientes al clado mencionado. En la Figura 12B se ilustra el número de exones e intrones de los genes de estas tetraspaninas. Nótese que la distribución y el número de intrones y exones está conservado en estos genes.

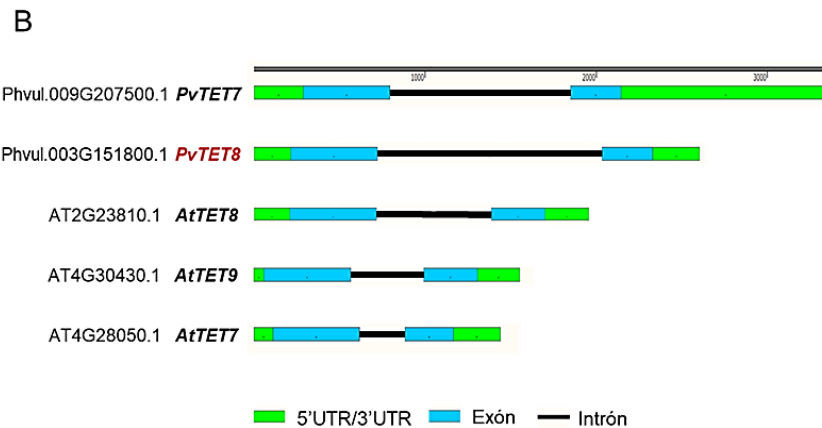
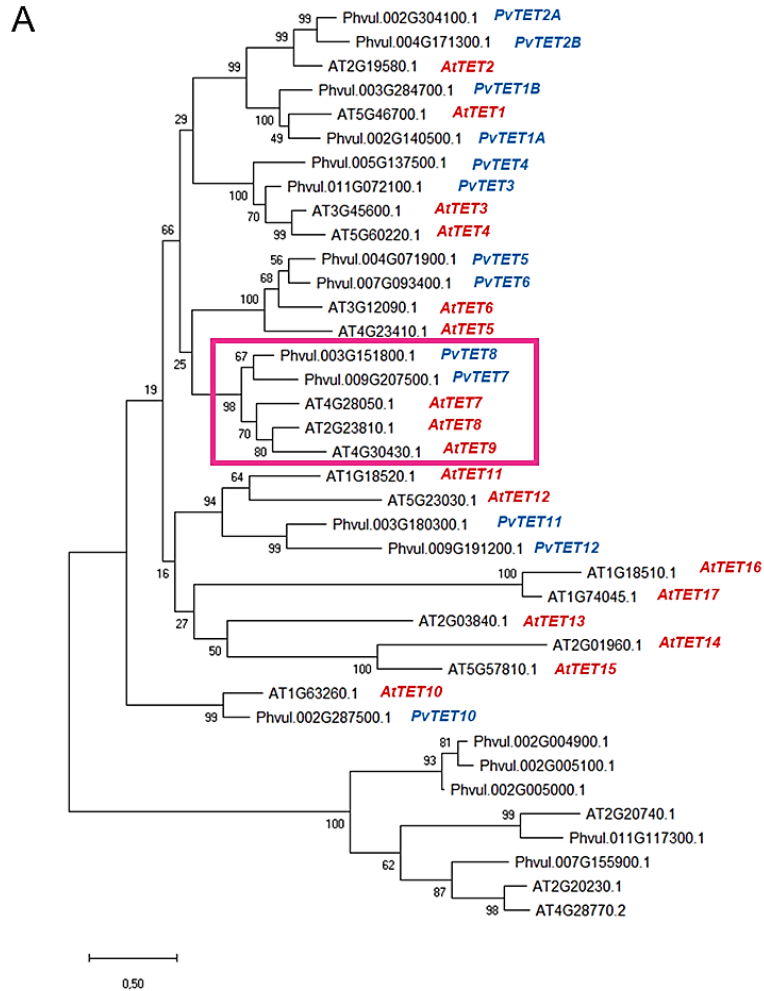


Figura 12. (A) Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de las tetraspaninas de *A. thaliana* y *P. vulgaris*. El árbol fue construido con el programa MEGA por el método de máxima verosimilitud con 1000 bootstraps. Los números sobre las ramas indican los valores de los porcentajes de bootstraps que coincidieron. (B) Estructura de los genes para las tetraspaninas de *P. vulgaris* y *A. thaliana* que pertenecen al clado del recuadro rosa. Las cajas verdes corresponden a las secuencias 5'UTR y 3'UTR, las cajas azules marcan a los exones y las líneas negras representan a los intrones. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos Phytozome y el esquema se realizó con el programa de SnapGene.

La proteína PvTET8 se localiza en la membrana plasmática y la sobreexpresión del gen incrementa el número y el tamaño de los nódulos

La fusión traduccional *35S::PvTET8:GFP*, se usó en una primera etapa para determinar la localización subcelular de *PvTET8:GFP* y, en una segunda etapa, para analizar el fenotipo de la sobreexpresión en la nodulación. Para esto, la CDS sin intrones del gen *PvTET8* (805 pb) se clonó en el vector de entrada *pENTR*. El vector *pENTR-PvTET8* se recombinó con el vector destino *pH7FWG2* para generar al constructo de sobreexpresión del gen *PvTET8* que se denominó *35S::PvTET8:GFP* y se movilizó tanto a *A. tumefaciens* como a *A. rhizogenes*. En la Figura 13A, se muestra un gel de electroforesis de los amplicones de PCR de las colonias de *A. rhizogenes* portadoras de la construcción molecular *35S::PvTET8:GFP*. Los productos marcados en el gel de agarosa presentan un tamaño de 805 pb, similar al obtenido en una electroforesis *in silico* (Figura 13B), sugiriendo que el producto de PCR corresponde a la CDS sin intrones del gen *PvTET8*. Además, por secuenciación se confirmó que los vectores portaran la CDS sin intrones.

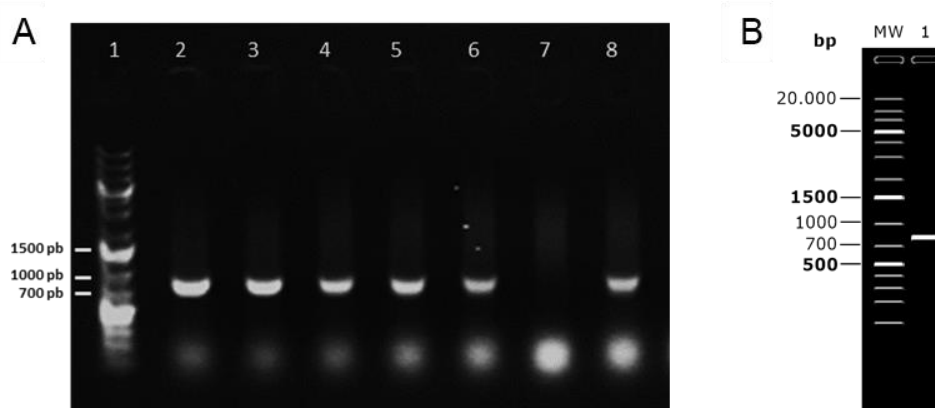


Figura 13. Análisis de la CDS del gen *PvTET8* clonado en el vector *pH7FWG2*. (A) Electroforesis en gel de agarosa con los amplicones de PCR (805 pb) de colonias de *A. rhizogenes* portadoras del vector *pH7FWG2::PvTET8*. Carril 1: marcador de peso molecular (*GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*, *Thermo Scientific*); carriles 2-6: colonias positivas; carril 7: colonia negativa, y carril 8: control positivo (colonia de *E. coli* portadora del vector *pH7FWG2::PvTET8*). (B) Simulación de la electroforesis en gel de la CDS sin intrones de *PvTET8* (*SnapGene*).

La localización subcelular de la proteína *PvTET8* se determinó por expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* y estable en los pelos radicales de *P. vulgaris*. Mediante microscopía confocal se observó que en las células de la epidermis de *N. benthamiana*, la proteína de fusión *PvTET8:GFP* se localiza en la membrana plasmática (Figura 14 B y C, ver flechas), a diferencia de la construcción *35S::GFP*, que muestra una localización subcelular preferentemente en el citoplasma (Figura 14A). De igual forma, en el

caso de los pelos radicales de *P. vulgaris*, se observó que la proteína PvTET8:GFP se localiza específicamente en la membrana celular, acumulándose preferentemente en el dominio apical (Figura 14D, ver flechas). Además, tanto en las células de las hojas, como en los pelos radicales se observó la presencia de estructuras similares a vesículas intracelulares (Figura 14 B y E, ver puntas de flechas).

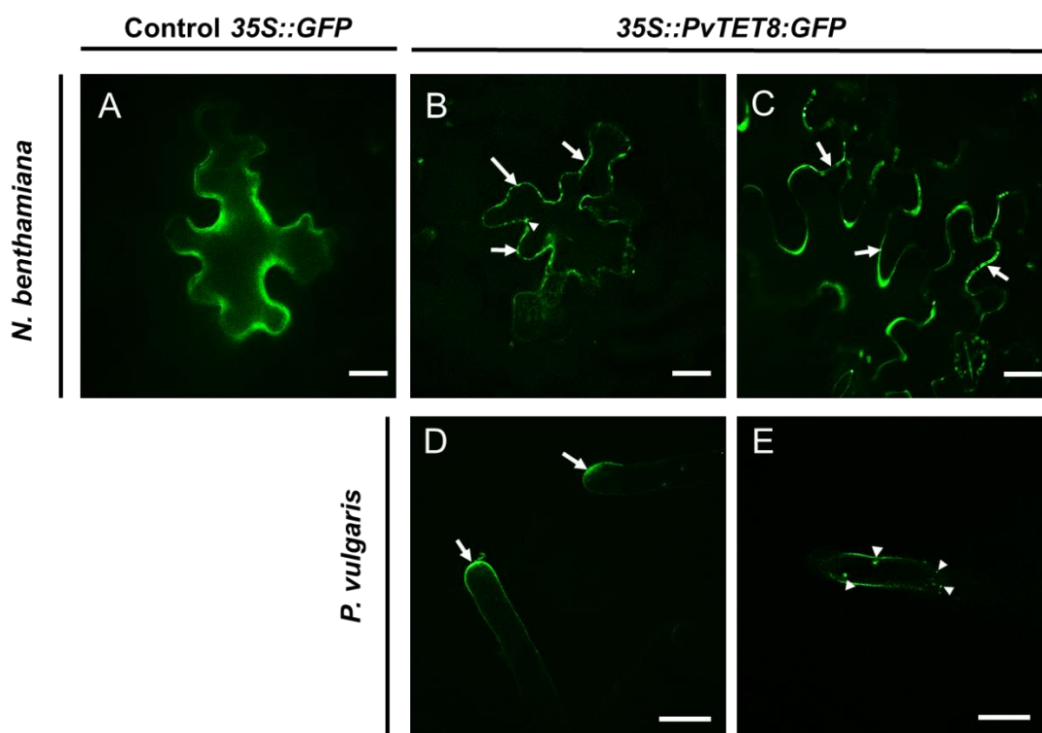


Figura 14. Localización subcelular de PvTET8:GFP. (A-C) Células de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* que expresan las construcciones 35S::GFP (A; control) y 35S::PvTET8:GFP (B y C). (D y E) Pelos radicales de *P. vulgaris* que expresan la construcción 35S::PvTET8:GFP. Las flechas indican la localización de PvTET8 en la membrana y las cabezas de flecha indican las vesículas. Imágenes capturadas con un microscopio confocal a un aumento de 400x; las barras corresponden a 20 μ m.

Con *A. rhizogenes* se generaron raíces transformadas con la construcción 35S::PvTET8:GFP para sobreexpresar el gen PvTET8:GFP; previamente la cepa utilizada se identificó por PCR y se probó su eficiencia para generar raíces pilosas. A partir de este análisis, se decidió utilizar las dos clonas que mostraron la mayor capacidad de generar raíces, a las cuales se les llamó 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2. Mediante qRT-PCR se determinó la acumulación del transcrito de PvTET8 en las raíces pilosas fluorescentes que expresaban las construcciones 35S::GFP (control), 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2. En el caso de 35S::PvTET8 1 se detectó un incremento de 3.6 veces de la acumulación del

transcrito respecto al control 35S::GFP, mientras que para 35S::PvTET8 2 se determinó un aumento de 4.7 veces (Figura 15).

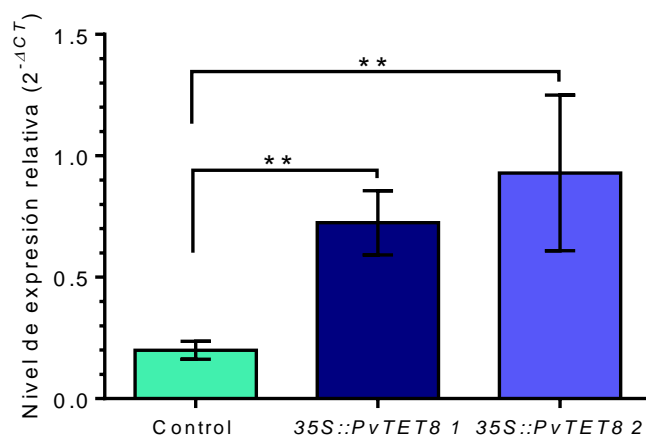


Figura 15. Nivel de expresión del gen PvTET8 en raíces transgénicas 35S::PvTET8. (A) Nivel de expresión relativa normalizada de PvTET8 evaluada en raíces transformadas con 35S::GFP (control), 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2. La acumulación del transcrito se normalizó con la expresión del gen de referencia EF1α. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes (n=6). Las diferencias significativas se determinaron usando un ANOVA, seguido de una prueba de Tukey (**: P≤0.01); las barras de error representan la desviación estándar (SD).

En las raíces transformadas con la construcción 35S::PvTET8:GFP, se determinó el efecto de la sobreexpresión del gen sobre la nodulación. Las raíces de las plantas compuestas transformadas con las construcciones 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2 a los 21 dpi con *R. tropici*, mostraron incrementos significativos en el número de nódulos del 128% y del 88%, respectivamente, comparados con las raíces control (Figura 16A). Asimismo, el peso seco total de los nódulos de las plantas compuestas 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2 tuvieron incrementos significativos del 121% y 129%, respectivamente, en comparación con las plantas control (Figura 16B). También se calculó el tamaño individual de los nódulos de cada grupo, observándose que las plantas compuestas transformadas con las construcciones 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2 tuvieron nódulos 27% más grandes que los nódulos de las plantas control (Figura 16C). Asimismo, se evaluó la capacidad de los nódulos para la fijación biológica del nitrógeno por el ensayo de reducción de acetileno. En la Figura 16D, se puede observar que los nódulos provenientes de las raíces transformadas con las construcciones 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2 tuvieron una disminución de la actividad de la nitrogenasa respectiva del 25% y 42%, comparada con su control.

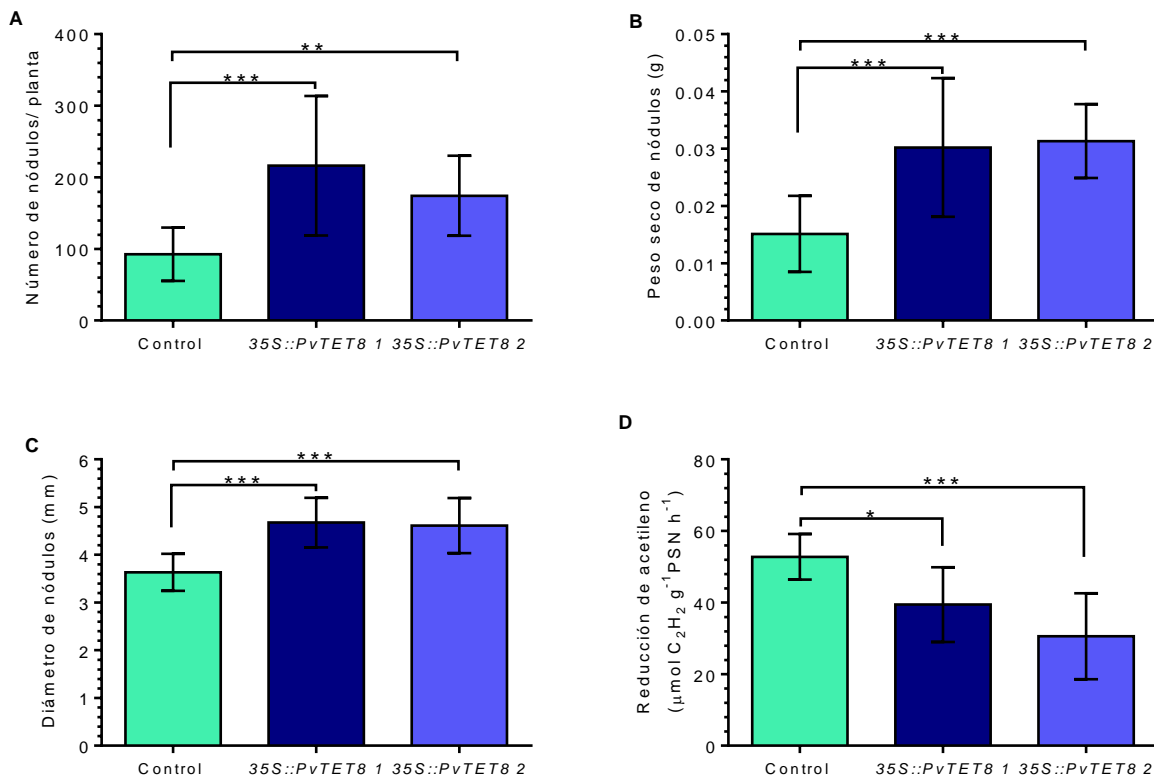


Figura 16. Análisis cuantitativo de diferentes parámetros de nódulos desarrollados en plantas compuestas transformadas con las construcciones 35S::GFP (control), 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2, de 21 dpi con *R. tropici*. (A) Número de nódulos presentes por planta. (B) Peso seco total de los nódulos presentes por planta. (C) Diámetro de los nódulos. (D) Análisis cuantitativo indirecto de la fijación biológica del nitrógeno de los nódulos. La actividad de la nitrogenasa se determinó por un ensayo de reducción de acetileno; PSN: peso seco de nódulos. Todos los datos representan el promedio de dos experimentos independientes ($n=20$ plantas). Se hizo un ANOVA seguido de una prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas (*: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$); las barras de error representan la SD.

Para determinar el estado de colonización de los rizobios dentro de los nódulos sobreexpresantes del gen *PvTET8*, las raíces transgénicas se inocularon con *R. tropici* DsRED. En las imágenes de la Figura 17, se distingue que los nódulos de las construcciones 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2, se desarrollaron en un patrón de racimo con un tamaño mayor, un color rosado más intenso (relacionado con la acumulación de leghemoglobina; paneles D y G) y un área roja fluorescente más extensa (conferida por *R. tropici*; paneles F e I) en comparación con los nódulos de las plantas control (paneles A-C).

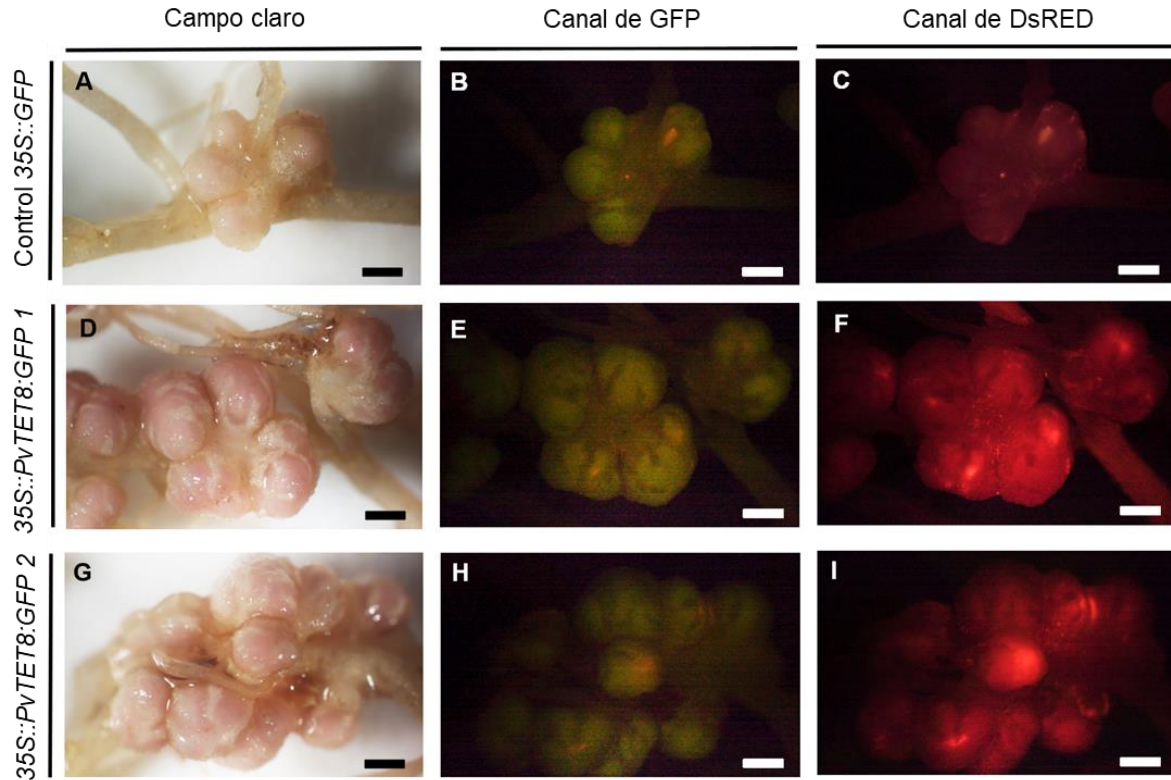


Figura 17. Nódulos de plantas compuestas transformadas con las construcciones 35S::GFP (control; A-C), 35S::PvTET8:GFP 1 (D-F) y 35S::PvTET8:GFP 2 (G-I) inoculadas con *R. tropici* DsRED (21 dpi). Todas las raíces transgénicas expresan GFP (distinguidas en el canal GFP), mientras que *R. tropici* sintetiza una proteína rojo fluorescente (observada en el canal DsRED). Imágenes representativas de 30 campos focales, capturadas con un estereoscopio con un aumento de 20x; las barras corresponden a 2 mm.

Además, se midieron parámetros de crecimiento de las plantas compuestas de los tres grupos (21 dpi). En las Figuras 18A y 18B, se observa que no hubo cambios significativos en el peso seco de la raíz, ni en la altura entre las plantas compuestas en ninguno de los tratamientos. De manera interesante, las plantas transformadas con las construcciones 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2 tuvieron un incremento significativo del 89% del peso seco de sus hojas respecto a las plantas transformadas con el vector vacío (Figura 18C). Con estos datos, es posible sugerir que las plantas compuestas con la sobreexpresión de *PvTET8* tuvieron un mejor crecimiento bajo las condiciones de nodulación.

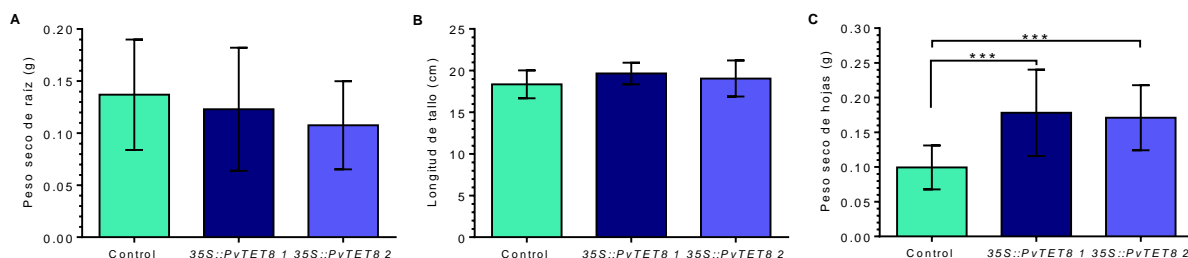


Figura 18. Parámetros de crecimiento de las plantas compuestas transformadas con las construcciones 35S::GFP (control), 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2 inoculadas con *R. tropici* (21 dpi). Los datos corresponden al promedio del peso seco de raíz (A), a la longitud del tallo (B) y al peso seco de hojas (C) de dos experimentos independientes ($n=20$ plantas). Las diferencias significativas (***) se determinaron usando un ANOVA seguido de una prueba de Tukey; las barras de error representan la SD.

El silenciamiento del gen *PvTET8* en *P. vulgaris* reduce el número y el tamaño de los nódulos afectando la fijación biológica de nitrógeno

Se determinó el efecto del silenciamiento de la expresión del gen *PvTET8*, dirigida por la construcción *PvTET8-RNAi*, en la nodulación. Inicialmente, un ARN interferente que consistió en un fragmento de 231 bases de la secuencia 5'UTR del gen *PvTET8*, se clonó en el vector de entrada *pENTR*. El vector *pENTR-PvTET8RNAi* se recombinó con el vector destino *pTDT-RNAi* para obtener a la construcción final denominada *PvTET8-RNAi*, y con la cual se transformó a *A. rhizogenes*. En la Figura 19A se muestra la electroforesis de los amplicones de PCR de colonias de *A. rhizogenes* que resultaron de la transformación con la construcción *PvTET8-RNAi*. Los productos marcados en el gel de agarosa se localizaron entre los marcadores de peso molecular de 200 y 300 pb, al igual que en la simulación de la electroforesis del RNAi de *PvTET8* (Figura 19B). Asimismo, por secuenciación se confirmó que los vectores portaran el ARN interferente.

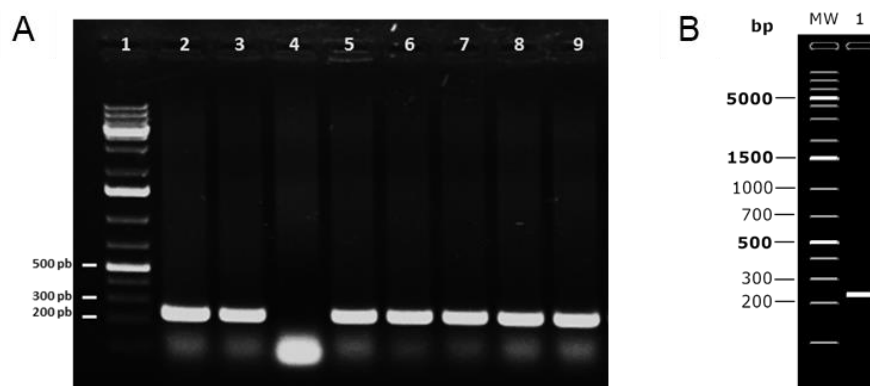


Figura 19. Análisis del RNAi para *PvTET8* clonado en el vector *pTDT-RNAi*. (A) Gel de agarosa con los amplicones de PCR (231 pb) de colonias de *A. rhizogenes* positivas a la transformación con la construcción *PvTET8-RNAi*. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific); carril 2: control positivo (colonia de *E. coli* portadora del vector *PvTET8-RNAi*); carriles 3 y 5-9: colonias positivas de *A. rhizogenes*; carril 4: colonia negativa. (B) Simulación de la electroforesis en gel del RNAi de *PvTET8*.

Se probó la eficiencia para generar raíces pilosas de las colonias de *A. rhizogenes* transformadas con la construcción *PvTET8-RNAi*. A partir de esta evaluación, se decidió utilizar las dos clonas que mostraron la mayor capacidad de generar raíces, a las cuales se les denominó *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*. Para confirmar que las raíces transgénicas presentaban menor abundancia del transcrito del gen *PvTET8*, se realizó un qRT-PCR con iniciadores específicos (Tabla 3). Las raíces transformadas con la clona *PvTET8-RNAi 1* mostraron una disminución del 67% en la acumulación del transcrito respecto a las raíces control, mientras que las raíces transformadas con la clona *PvTET8-RNAi 2* presentaron un decremento del 76% en este transcrito, valores que resultaron estadísticamente significativos (Figura 20).

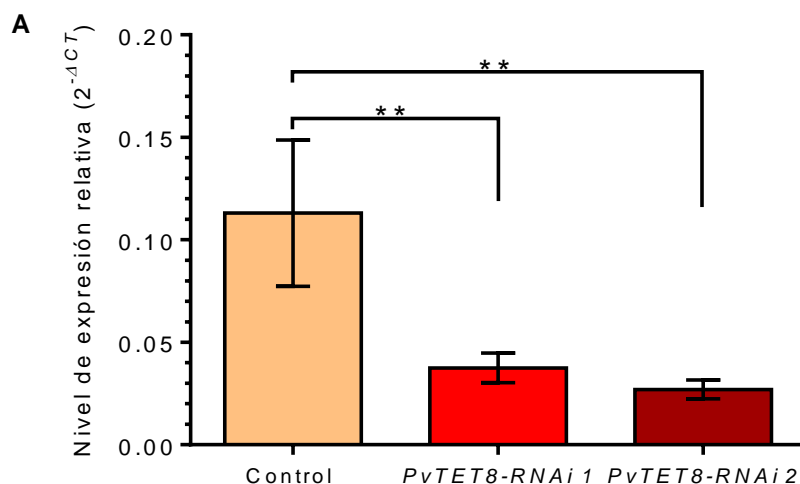


Figura 20. Nivel de expresión relativa de *PvTET8* en raíces transgénicas *PvTET8-RNAi*. (A) Acumulación del transcrito de *PvTET8* analizado en raíces transformadas con los vectores *pTDT-RNAi* (control), *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*. La acumulación del transcrito se normalizó con la expresión del gen de referencia *EF1α*. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes ($n=6$). Las diferencias significativas se determinaron usando un ANOVA seguido de una prueba de Tukey (**: $P \leq 0.01$); las barras de error representan la SD.

Después se prosiguió a analizar el fenotipo derivado del silenciamiento del gen en la nodulación. Las raíces transformadas con las construcciones *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*, inoculadas con *R. tropici* (21 dpi), mostraron una disminución estadísticamente significativa del 31% y 44% en el número de nódulos respectivamente, en comparación con las raíces control (Figura 21A). De igual forma, el peso seco total de los nódulos tuvo una reducción significativa del 36% y 49%, respectivamente, en comparación con las plantas transformadas con el control (Figura 21B). El análisis del tamaño individual de los nódulos de cada grupo mostró que las plantas de *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2* tuvieron nódulos

36% y 46% más pequeños, respectivamente, en comparación con el tamaño de los nódulos de las plantas control (Figura 21C). Además, se analizó la actividad de la nitrogenasa de los nódulos, encontrándose que aquellos de las plantas *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2* tuvieron una disminución del 36% y del 45% en la reducción de acetileno, respecto a los nódulos de las raíces transformadas con el vector control (Figura 21D).

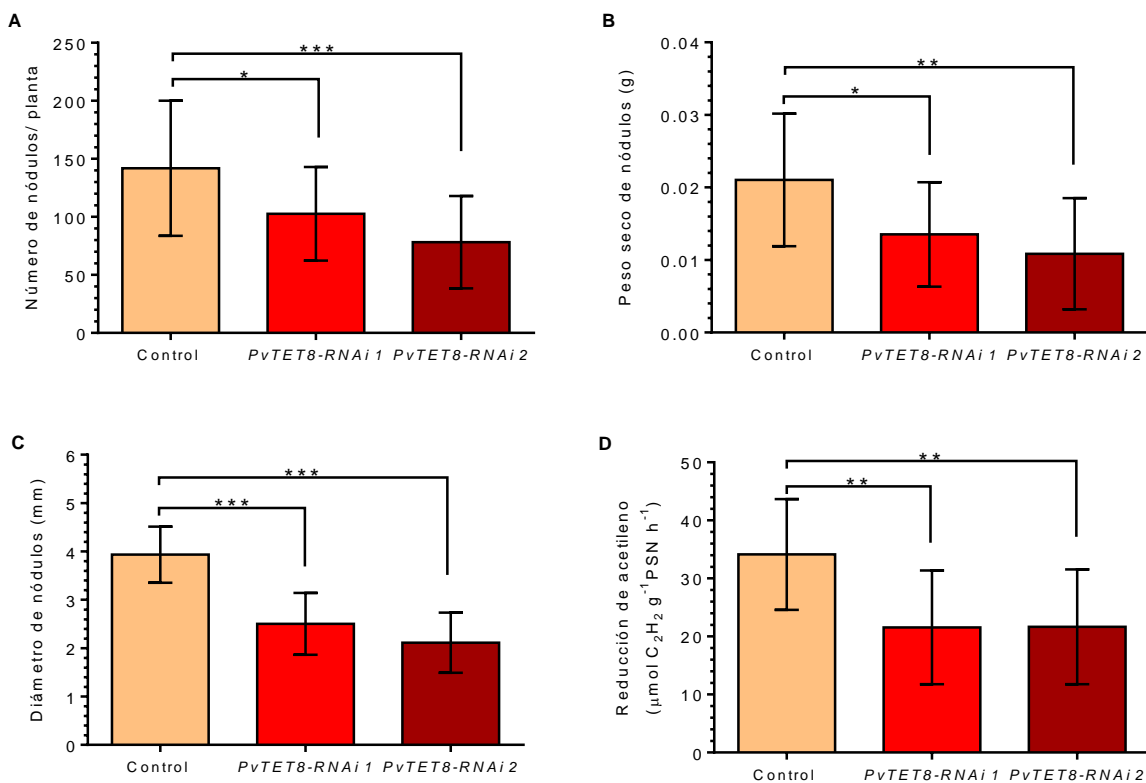


Figura 21. Análisis cuantitativo de distintos parámetros de nódulos desarrollados en plantas compuestas transformadas con los vectores *pTDT-RNAi* (control), *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*, inoculadas con *R. tropici* (21 dpi). (A) Número de nódulos por planta. (B) Peso seco total de nódulos por planta. (C) Diámetro de los nódulos. (D) Actividad de la nitrogenasa medida por la reducción de acetileno; PSN: peso seco de nódulos. Todos los datos representan el promedio de dos experimentos independientes ($n=20$ plantas). Las diferencias significativas se determinaron haciendo un ANOVA seguido de una prueba de Tukey (*: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$); las barras de error representan la SD.

Las raíces transformadas en donde se silenció a *PvTET8*, se inocularon con *R. tropici* GFP para determinar el estado de colonización de los rizobios en los nódulos. En la Figura 22 se observa que las raíces con las construcciones *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*, presentaron nódulos más pequeños y blancos (relacionado con la ausencia de leghemoglobina; paneles D y G), además de una reducida infección de *R. tropici* GFP (paneles F e I), en comparación con los nódulos de las plantas control (paneles A-C). Cabe mencionar que el sistema de transformación por *A. rhizogenes* puede ocasionalmente

generar zonas mosaico. Es decir, algunas zonas de la raíz se transforman y otras no. De esta forma, la colonización de *Rhizobium* aumentó drásticamente en los nódulos que no expresaban la construcción de silenciamiento (determinada por la ausencia de la proteína roja fluorescente que lleva el vector de expresión; Figura 22 E y F, ver flechas).

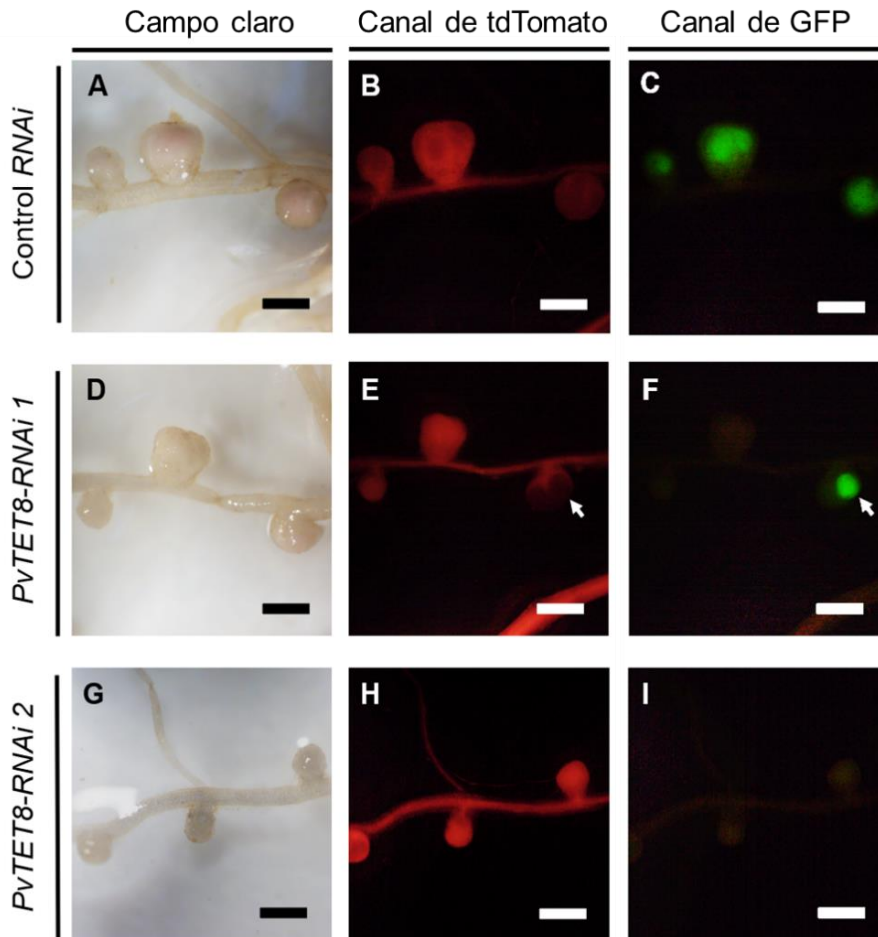


Figura 22. Morfología de nódulos de raíces transformadas con las construcciones *pTDT-RNAi* (control; A-C), *PvTET8-RNAi 1* (D-F) y *PvTET8-RNAi 2* (G-I), inoculadas con *R. tropici* GFP (21 dpi). Todas las raíces transgénicas sintetizan a una proteína roja fluorescente (distinguidas en el canal tdTomato), mientras que *R. tropici* sintetiza a GFP (observada en el canal GFP). Las flechas señalan a un nódulo sin silenciamiento del gen *PvTET8*. Imágenes representativas de 30 campos focales, capturadas con un estereoscopio con un aumento de 20x; las barras de escala corresponden a 2 mm.

También se evaluaron los parámetros de crecimiento de las plantas compuestas inoculadas con *R. tropici* (21 dpi). En los tres paneles de la Figura 23, se muestra que entre las plantas compuestas de los tres diferentes grupos no hubo cambios significativos en el peso seco de raíz, en la longitud del tallo, ni en el peso seco de las hojas.

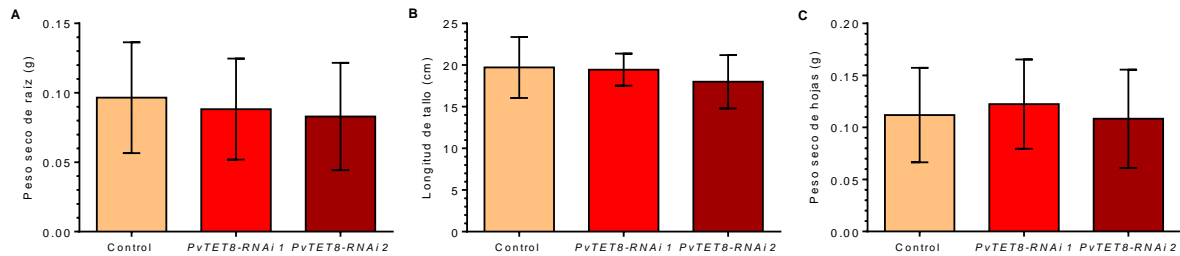


Figura 23. Parámetros de crecimiento de plantas compuestas transformadas con los vectores pTDT-RNAi (control), PvTET8-RNAi 1 y PvTET8-RNAi 2, inoculadas con *R. tropici* (21 dpi). Los datos corresponden al promedio del peso seco de raíz (A), de la longitud del tallo (B) y del peso seco de hojas (C) de dos experimentos independientes ($n=20$ plantas). Se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey para identificar cambios significativos con una $P \leq 0.05$; las barras de error representan la SD.

El promotor del gen *PvTET8* se activa en raíces de *P. vulgaris* durante la simbiosis micorrícica arbuscular

Debido a que la actividad del promotor del gen *PvTET8* (*pPvTET8*) ya se había analizado en condiciones de nodulación, en este trabajo sólo se determinó la actividad de este promotor bajo condiciones de micorrización (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2019b). Inicialmente, se analizaron mediante el ensayo de GUS raíces sin inocular transformadas con la construcción *pPvTET8::GUS:GFP*, en éstas se observó que el promotor de *PvTET8* está activo en los primordios de las raíces laterales, en los meristemas apicales de la raíz y en los haces vasculares (Figura 24 A, B y C, respectivamente), con lo cual se confirmó lo reportado previamente (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2019b).

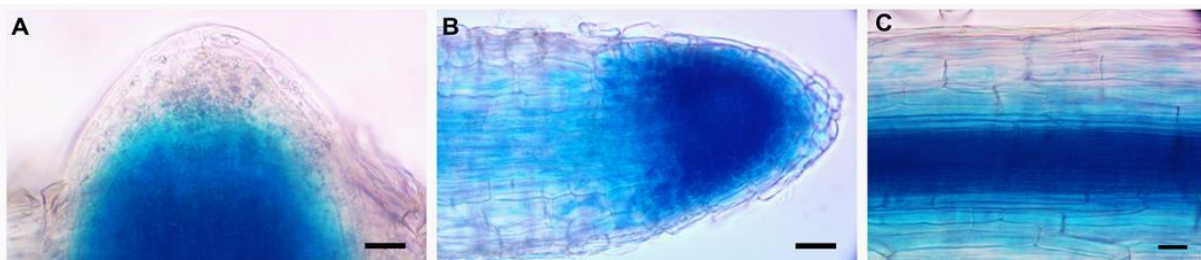


Figura 24. Actividad del promotor del gen *PvTET8::GUS:GFP* en raíces de *P. vulgaris* de 30 días no inoculadas. (A) Primordio de raíz lateral, (B) meristemo apical de raíz y (C) haz vascular. Se evaluaron raíces de 10 plantas de dos experimentos independientes. Imágenes representativas capturadas con un microscopio de luz transmitida a un aumento de 400x. La barra de escala corresponde a 20 μ m.

Para determinar la actividad del promotor del gen *PvTET8* en condiciones de micorrización, a las raíces transformadas con la construcción *pPvTET8::GUS:GFP* se les inoculó con el hongo *R. irregularis*. Con el ensayo de GUS se mostró que bajo las condiciones

de micorrización (30 dpi), el promotor del gen *PvTET8* está activo en diversas células del córtex interno de la raíz, lugar en donde los arbusculos se forman preferentemente (Figura 25 A-D, ver cabeza de flechas blancas). Este patrón resultó diferente respecto a las raíces sin inocular, en donde el promotor está activo en los haces vasculares (Figura 24C). Adicionalmente, las zonas con actividad del promotor en raíces micorrizadas se compararon con los sitios y patrones de formación de los arbusculos marcados por la fluorescencia del conjugado WGA-Alexa Fluor 488 (Figura 25 E-H). Estos resultados fueron consistentes con el desarrollo de los arbusculos que mostró la misma localización, tamaño y patrón de formación que las zonas con actividad del promotor, sugiriendo que el promotor del gen *PvTET8* está activo en las células del córtex interno que contienen arbusculos.

Los datos de la actividad del promotor *PvTET8*, indujeron la búsqueda de los elementos de regulación en *cis* potencialmente implicados en las interacciones mutualistas, localizados dentro de los 1000 pb empleados. Este análisis reveló la presencia de elementos regulatorios en *cis* implicados en la nodulación, la micorrización y la patogénesis, tanto en la cadena positiva (+) del ADN, como en la negativa (-). Dentro de los elementos encontrados se tienen tres motivos *NODCON1GM* (AAAGAT) localizados a -760(-), -781(+) y -870(-) y tres elementos *NODCON2GM* (CTCTT) situados a -240(-), -375(-) y -468(-) pb (Figura 25I). De igual forma, se encontró un motivo palindrómico *PHO* (CACGTG), también conocido como *G-Box* o *CACGTGMOTIF* (Chen *et al.*, 2011; Hatorangan *et al.*, 2009), que se localizó en las cadenas (-) y (+) a -541 pb del sitio del inicio de transcripción (Figura 25I). Otro de los elementos de regulación encontrados fueron cinco motivos *WRKY71OS* localizados a -142(-), -325(-), -386(+), -770(-) y -960(-) pb (Figura 25I). Así como el motivo *ARR1AT* (NGATT), que se presentó en 13 sitios diferentes del promotor de *PvTET8*, cuatro en la cadena positiva y nueve en la cadena negativa (Figura 25I).

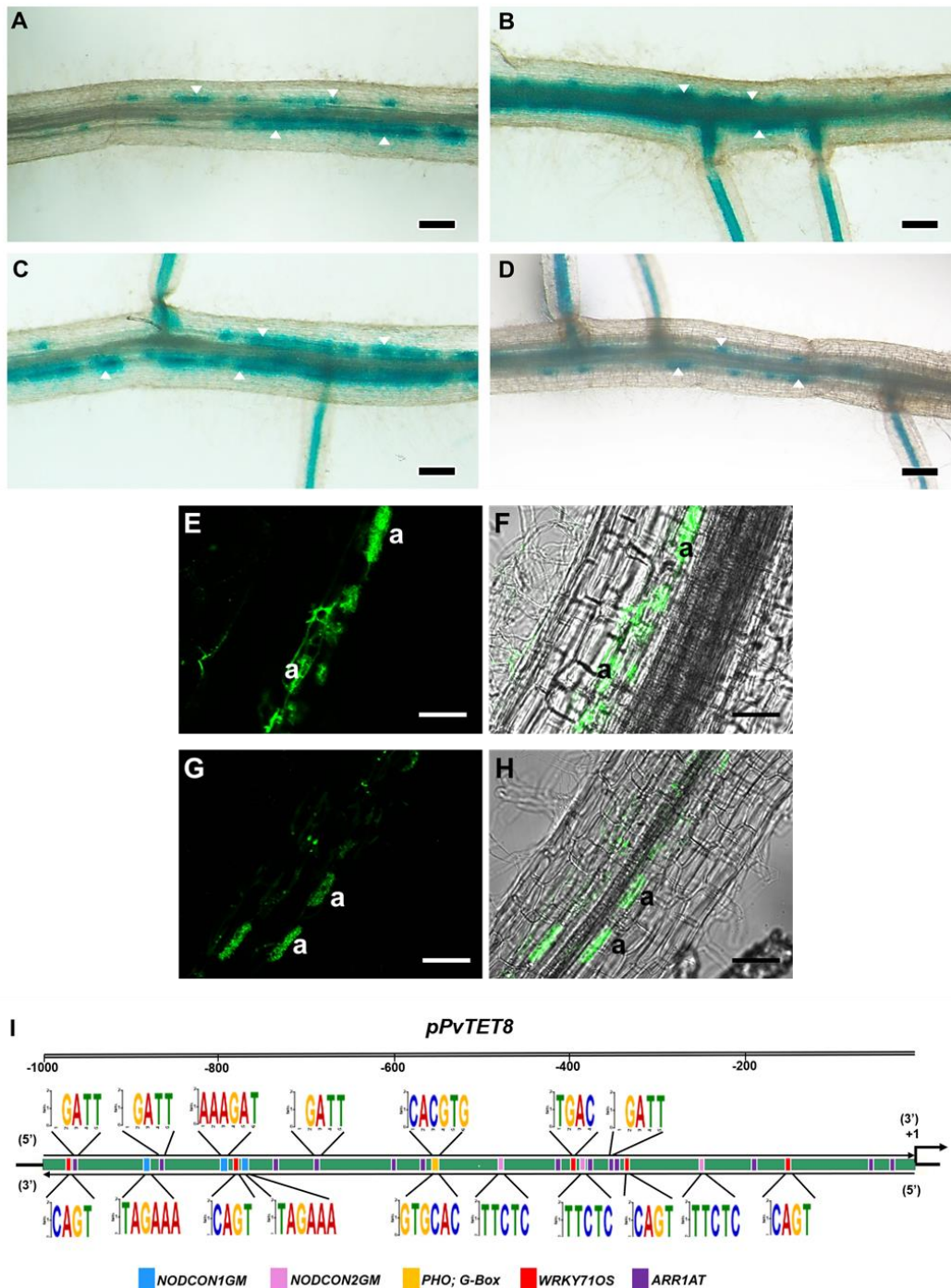


Figura 25. Análisis del promotor de *PvTET8* en condiciones de micorrización. (A-D) Actividad del promotor del gen *PvTET8::GUS-GFP* de raíces inoculadas con *R. irregularis* 30 dpi. Los cabezas de las flechas indican las zonas del córtex interno en donde se forman los arbusculos. Las imágenes fueron capturadas con un estereoscopio con un aumento de 56x; las barras de escala corresponden a 200 μ m. (E-H) Arbusculos (a) marcados con WGA-Alexa Fluor 488 en raíces inoculadas con *R. irregularis* 30 dpi. Imágenes capturadas con un microscopio confocal a un aumento de 200x; las barras de escala corresponden a 20 μ m. Las imágenes corresponden a dos experimentos independientes ($n=20$ plantas). (I) Elementos regulatorios en cis presentes en el promotor de *PvTET8* potencialmente involucrados en la simbiosis, localizados en la cadena positiva y negativa del ADN. El análisis in-silico de la secuencia de 1000 pb del promotor *PvTET8* se analizó con la base de datos NewPlace. El gráfico se diseñó con SnapGene y MEME Suite 5.3.3.

La sobreexpresión del gen *PvTET8* regula positivamente a la colonización micorrícica en *P. vulgaris* y a la expresión del gen *PvPT4*

Para el análisis funcional del gen *PvTET8* en condiciones de micorrización, inicialmente se observaron los efectos de la sobreexpresión de *PvTET8* sobre el fenotipo de plantas compuestas inoculadas con *R. irregularis*. Mediante las tinciones con azul de tripano se determinó el porcentaje de colonización micorrícica y la cuantificación de las estructuras simbióticas de las raíces transgénicas inoculadas con *R. irregularis* (30 dpi). En la Figura 26A se puede observar que, en cuanto al porcentaje de colonización total, no se presentó ningún cambio significativo entre los tres grupos de las plantas compuestas. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de colonización arbuscular, las raíces transformadas con las construcciones *35S::PvTET8 1* y *35S::PvTET8 2*, tuvieron un incremento significativo del 177% y 102%, respectivamente, en comparación con las raíces transformadas con la construcción control. Con la finalidad de caracterizar puntualmente el fenotipo de la colonización micorrícica, se realizó el conteo de los arbuscúlos, las vesículas, los sitios de infección y los apresorios por región de raíz colonizada, encontrándose que las raíces transformadas con las construcciones *35S::PvTET8 1* y *35S::PvTET8 2* tuvieron 16 y 13 veces más arbuscúlos, respectivamente, en comparación con las raíces transformadas con el control (Figura 26B). Además, no se observó la formación de vesículas, sitios de infección y apresorios en ninguno de los tratamientos (Figura 26B).

En las Figuras 26 F-H se muestran imágenes representativas de la colonización micorrícica teñidas con WGA-Alexa 488 que permiten una visualización más clara del desarrollo arbuscular en las células del córtex interno de la raíz. Notoria y consistentemente con los datos cuantitativos (Figura 26 A y B), se observó un aumento significativo en el desarrollo arbuscular en las líneas de sobreexpresión (Figura 26 D, E, G y H) en comparación con el control (Figura 26 C y F).

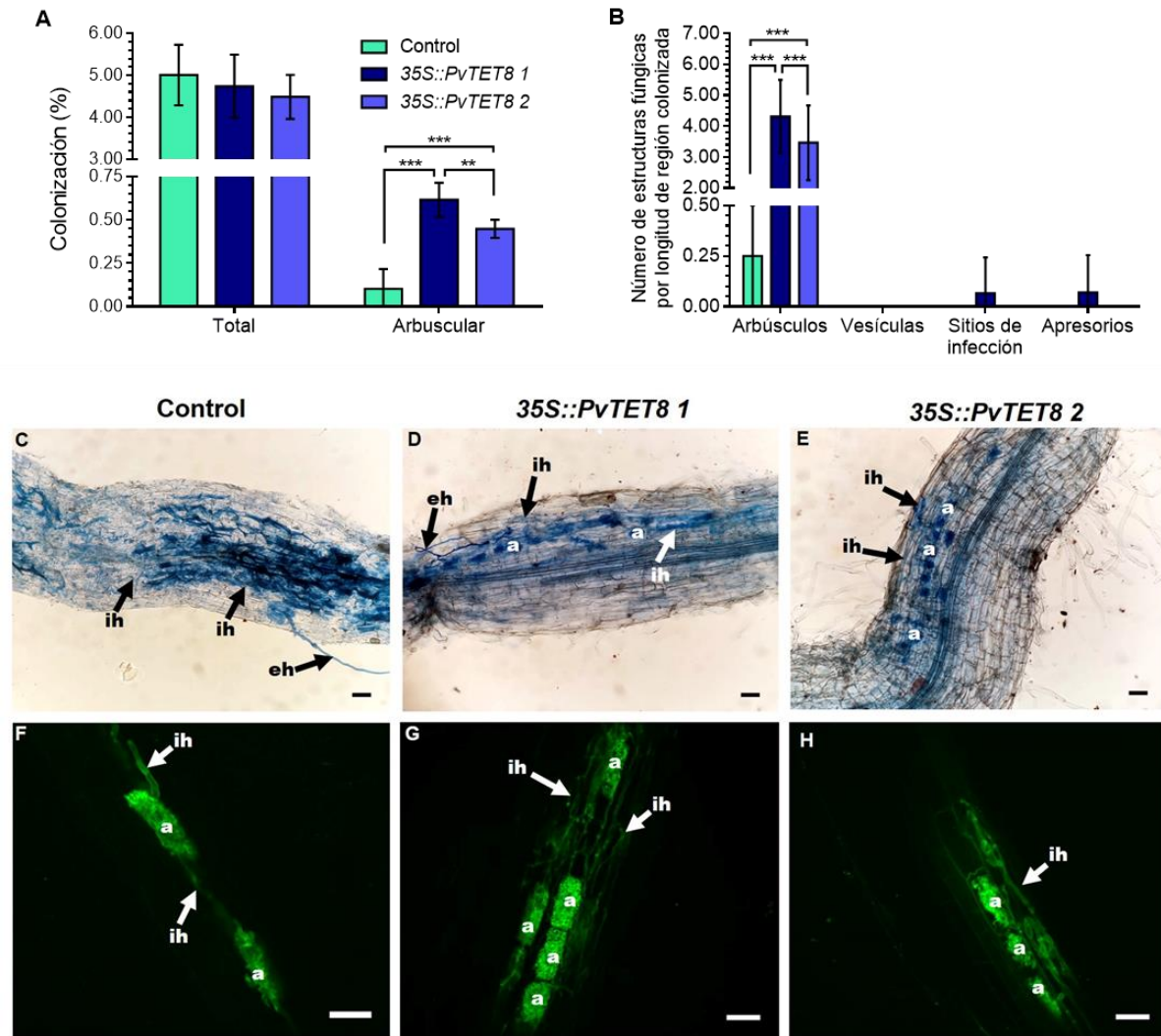


Figura 26. Colonización micorrícica de plantas compuestas transformadas con los vectores 35S::GFP (control), 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2, inoculadas con *R. irregularis* (30 dpi). (A) Cuantificación del porcentaje de colonización total (considera cualquier estructura micorrícica) y colonización arbuscular (considera únicamente arbúsculos) de dos experimentos independientes (n=10 plantas). (B) Cuantificación de estructuras fúngicas (arbúsculos, vesículas, sitios de infección y apresorios). Los datos corresponden a 120 fragmentos (1 cm) de raíces por planta de dos experimentos independientes (n=10 plantas). Se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey para identificar cambios significativos (**: $P \leq 0.01$ y ***: $P \leq 0.001$). Las barras de error representan la SD. (C-D) Imágenes representativas de la colonización micorrícica obtenidas con la tinción de azul de tripano; la barra de escala corresponde a 50 μm . (F-H) Imágenes representativas de la colonización micorrícica obtenidas con el marcaje de WGA-Alexa 488; la barra de escala corresponde a 20 μm . ih: hifa intraradicar, eh: hifa extraradicar, a: arbúsculo.

También, se midió la acumulación del transcrito de los genes *PvTET8* y *PvPT4* a los 30 dpi en las raíces transgénicas 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2 que fueron inoculadas (M+) o no inoculadas (M-) con *R. irregularis*, y se compararon con el control (35S::GFP). Las líneas de sobreexpresión de *PvTET8* presentaron un incremento en la acumulación del transcrito de

PvTET8, particularmente, la línea *35S::PvTET8 1 M+* aumentó 2.5 veces los niveles de expresión en comparación con su control (Figura 27A). Adicionalmente, se analizó la acumulación del transcrito del transportador de fosfato específico de la micorrización, *PvPT4*, el cual es ampliamente utilizado como un marcador molecular de la simbiosis AM. En estos experimentos se encontró que las líneas sobreexpresantes M+ tuvieron una mayor acumulación del transcrito de *PvPT4* en comparación con las plantas control (Figura 27). De manera destacable, las raíces transformadas con el constructo *35S::PvTET8:GFP 1* tuvieron un incremento significativo de 9 veces el nivel de expresión de *PvPT4* (Figura 27B). Como se esperaba, en las líneas de sobreexpresión M- no se detectó la acumulación del transcrito de *PvPT4* (Figura 27B).

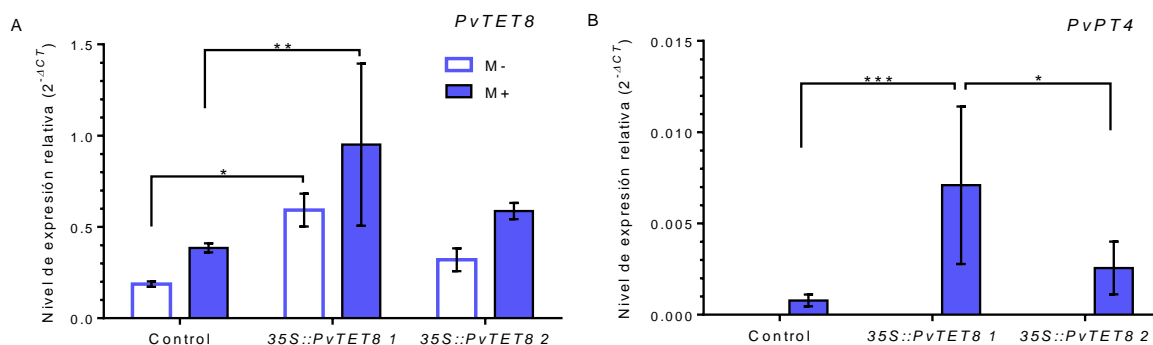


Figura 27. Nivel de expresión relativa de *PvTET8* (A) y *PvPT4* (B) de raíces transformadas con los vectores *35S::GFP* (control), *35S::PvTET8 1* y *35S::PvTET8 2* inoculadas (M+) y no inoculadas (M-) con *R. irregularis* (30 dpi). La acumulación del transcrito se determinó con la expresión del gen de referencia *EF1α*. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes (n=6). Las diferencias significativas se determinaron usando un ANOVA, seguido de una prueba de Tukey (**: $P \leq 0.01$ y ***: $P \leq 0.001$); las barras de error representan la SD.

Por otro lado, se midieron parámetros de crecimiento de los tres grupos de plantas compuestas M+ y M- a 30 dpi. En las Figuras 28 A y B se muestra que no hubo cambios significativos en el peso seco de la raíz, ni en la altura de las plantas compuestas en ninguno de los tratamientos. No obstante, las plantas transformadas con las construcciones *35S::PvTET8 1* y *35S::PvTET8 2* que fueron colonizadas, tuvieron un incremento significativo del 56% y 51% en el peso seco de sus hojas, respectivamente, en comparación con las plantas transformadas con el vector control (Figura 28C). Estos datos permiten sugerir que las plantas compuestas transformadas para la sobreexpresión de *PvTET8* tuvieron un mejor crecimiento bajo las condiciones de micorrización, como parece evidente en las imágenes de la Figura 28D.

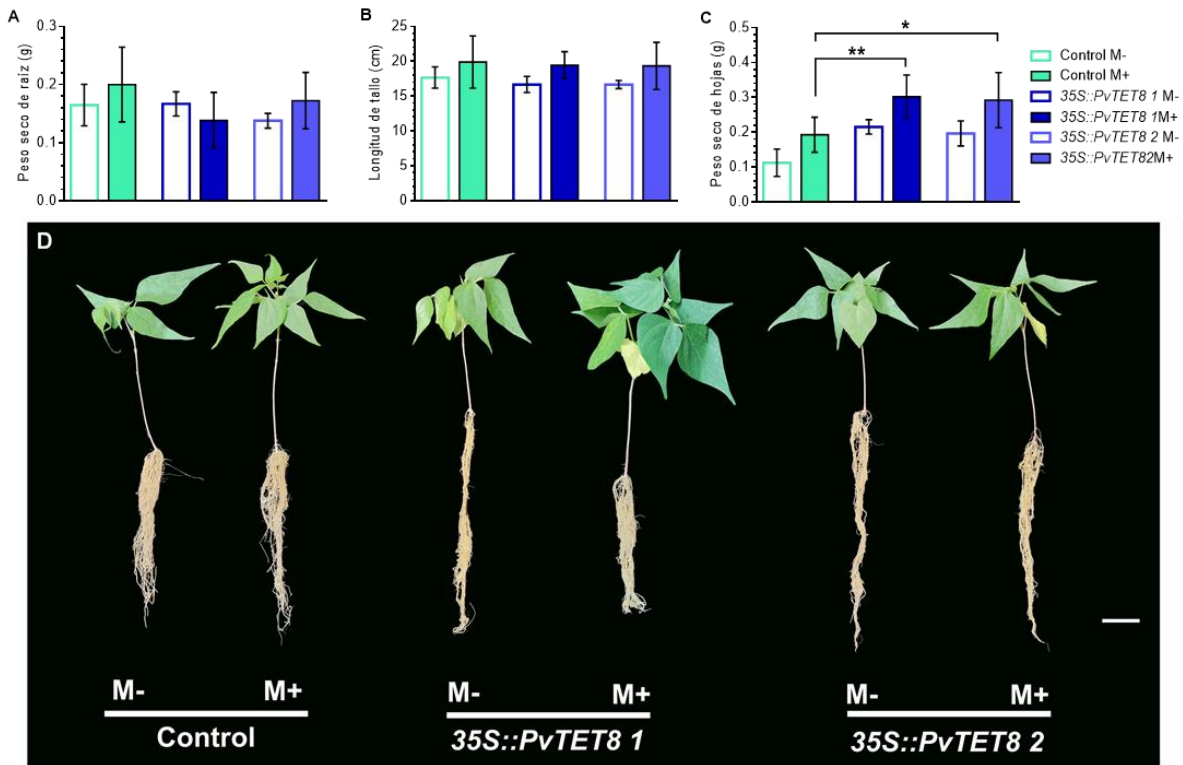


Figura 28. Parámetros de crecimiento de plantas compuestas transformadas con los vectores 35S::GFP (control), 35S::PvTET8 1 y 35S::PvTET8 2, inoculadas (M+; barras llenas) y no inoculadas (M-; barras vacías) con *R. irregularis* (30 dpi). (A) Peso seco de raíz. (B) Longitud de tallo. (C) Peso seco de hojas. Los datos corresponden a dos experimentos independientes ($n=10$ plantas). Se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey para identificar cambios significativos (*: $P\leq 0.05$ y **: $P\leq 0.01$). Las barras de error representan la SD. (D) Imágenes representativas de los tres grupos de plantas compuestas inoculadas (M+) o no (M-) con *R. irregularis* (30 dpi). La barra de escala corresponde a 5 cm.

El silenciamiento del gen *PvTET8* en *P. vulgaris* reduce la colonización micorrícica y disminuye la expresión del gen *PvPT4*

El análisis se continuó con la evaluación de los efectos del silenciamiento del gen *PvTET8* sobre la micorrización. Con la tinción de azul de tripano se cuantificó la colonización micorrícica de las raíces transgénicas inoculadas con *R. irregularis* (30 dpi). En la Figura 29A se puede observar que, las raíces transformadas con las construcciones *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2* tuvieron respectivamente un decremento significativo del 58% y 60% en el porcentaje de colonización total respecto a las raíces control; de manera similar, estos grupos tuvieron una reducción significativa del 67% y 68% en el porcentaje de colonización arbuscular (Figura 29A). Al cuantificar las estructuras micorrícicas presentes en los fragmentos de raíces se encontró que, las plantas transformadas con las construcciones *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*, tuvieron respectivamente 67% y 57% menos arbusculos

respecto a las plantas control (Figura 29B). Sin embargo, en las raíces transformadas con las construcciones *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2* se encontró un aumento en el número de vesículas, sitios de infección y apresorios (5, 45 y 33 veces más, respectivamente), en comparación con las raíces control (Figura 29 B-E). Además, pareciera que los arbusculos formados en las raíces silenciadas están menos ramificados (Figura 29 G y H) en comparación con las raíces control (Figura 29F).

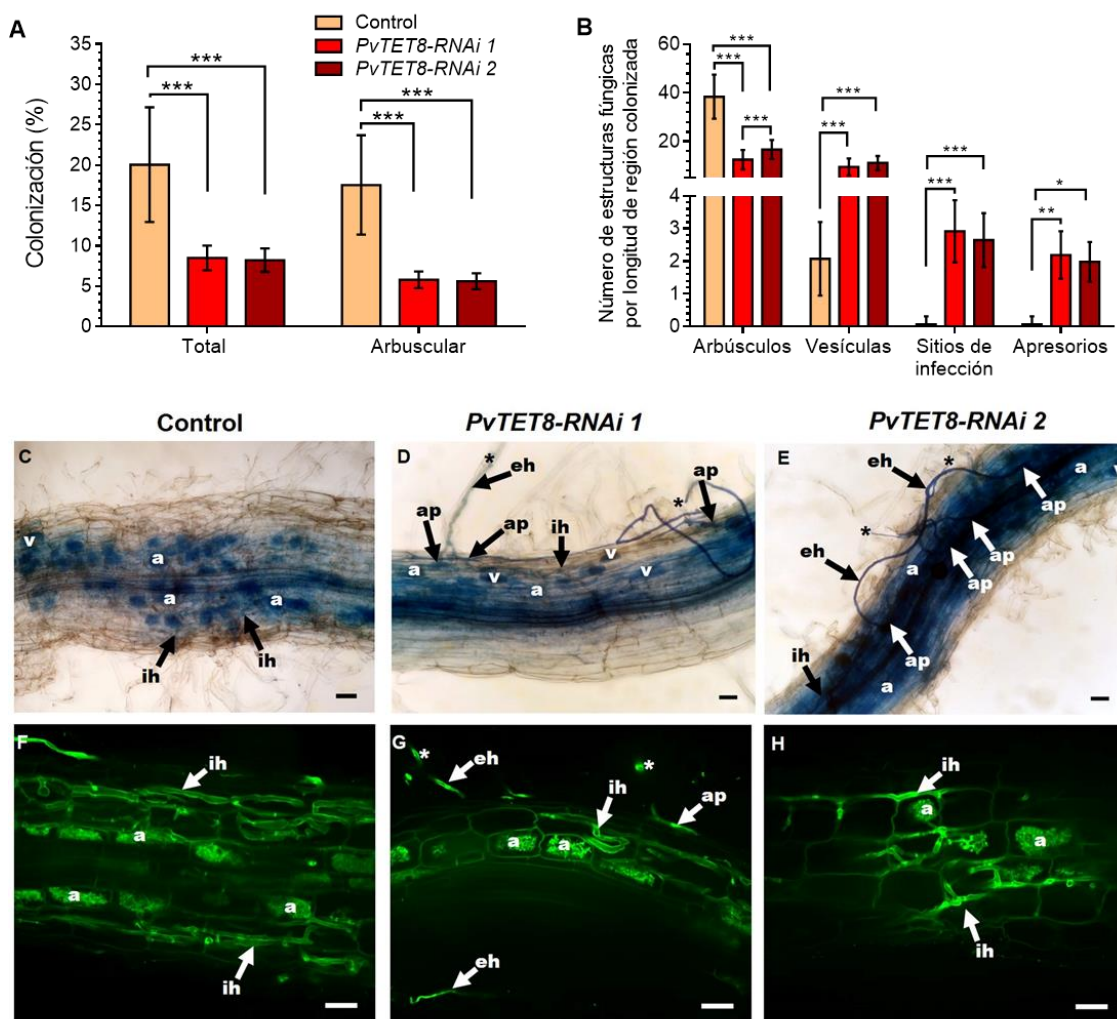


Figura 29. Colonización micorrícica de plantas compuestas transformadas con los vectores *pTDT-RNAi* (control), *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*, inoculadas con *R. irregularis* (30 dpi). (A) Cuantificación del porcentaje de colonización total (considera cualquier estructura micorrícica) y colonización arbuscular (considera únicamente arbusculos) de dos experimentos independientes ($n=10$ plantas). (B) Cuantificación de estructuras fúngicas (arbusculos, vesículas, sitios de infección y apresorios). Los datos corresponden a 120 fragmentos (1 cm) de raíces por planta de dos experimentos independientes ($n=10$ plantas). Se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey para identificar cambios significativos (*: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ y ***: $P \leq 0.001$). Las barras de error representan la SD. (C-D) Imágenes representativas de la colonización micorrícica obtenidas con la tinción de azul de tripano; la barra de escala corresponde a 50 μm . (F-H) Imágenes representativas de la colonización micorrícica obtenidas con el marcaje de WGA-Alexa 488; la barra de escala corresponde a 20 μm . ap: apresorio, v: vesícula, ih: hifa intraradicular, eh: hifa extraradicular, a: arbusculo.

Adicionalmente, se midió la cuantificación de la acumulación de los transcritos de *PvTET8* y *PvPT4* en raíces transgénicas *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2* a los 30 dpi colonizadas (M+) y no colonizadas (M-) con *R. irregularis*. En este caso, se encontró que, a medida que se disminuye la expresión de *PvTET8* (Figura 30A), se reduce la expresión de *PvPT4* (Figura 30B), que es el efecto contrario al observado en la sobreexpresión. Las raíces transformadas con las construcciones *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2* colonizadas tuvieron una reducción significativa del 70% y 80% de la expresión de *PvTET8* respecto a las raíces control, asimismo presentaron un decremento del 42% y 58% del nivel de expresión de *PvPT4* respecto a las raíces transformadas con el vector control (Figura 30 A y B). Por otro lado, como se esperaba, en las líneas de silenciamiento M- no se detectó la acumulación del transcrito de *PvPT4* (Figura 30B).

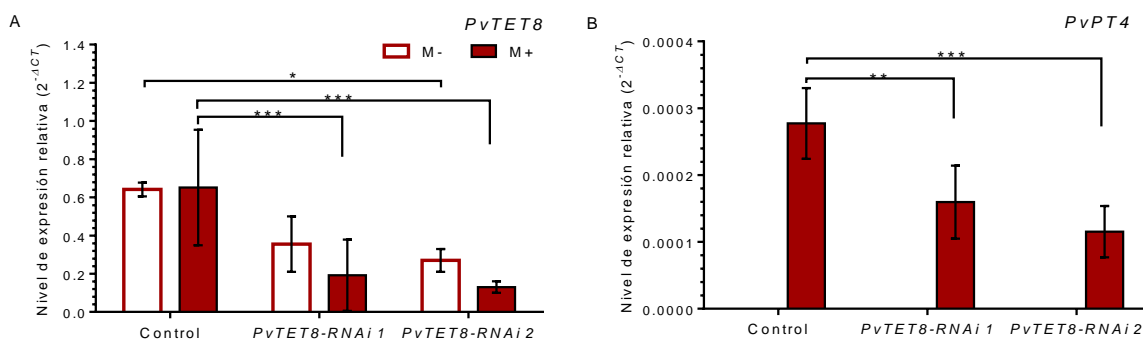


Figura 30. Nivel de expresión relativa de *PvTET8* (A) y *PvPT4* (B) de raíces transformadas con los vectores *pTDT-RNAi* (control), *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*, inoculadas con *R. irregularis* (30 dpi). La acumulación del transcrito se normalizó con la expresión del gen de referencia *EF1α*. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes (n=6). Las diferencias significativas se determinaron usando un ANOVA, seguido de una prueba de Tukey (**: P ≤ 0.01 y ***: P ≤ 0.001); las barras de error representan la SD.

Aunada a la cuantificación de la colonización micorrícica, se midieron parámetros de crecimiento de las plantas compuestas inoculadas o no con *R. irregularis* (30 dpi). En la Figura 31 se puede observar que, la inoculación con las micorrizas aumentó el peso seco de raíz de los tres grupos, sin embargo, este incremento por la micorrización fue menor en las plantas transformadas con la construcción *PvTET8-RNAi 2* (paneles A y D). Al evaluar la longitud del tallo y el peso seco de las hojas, no se encontraron cambios significativos dentro de los grupos analizados (Figura 31 B, C y D).

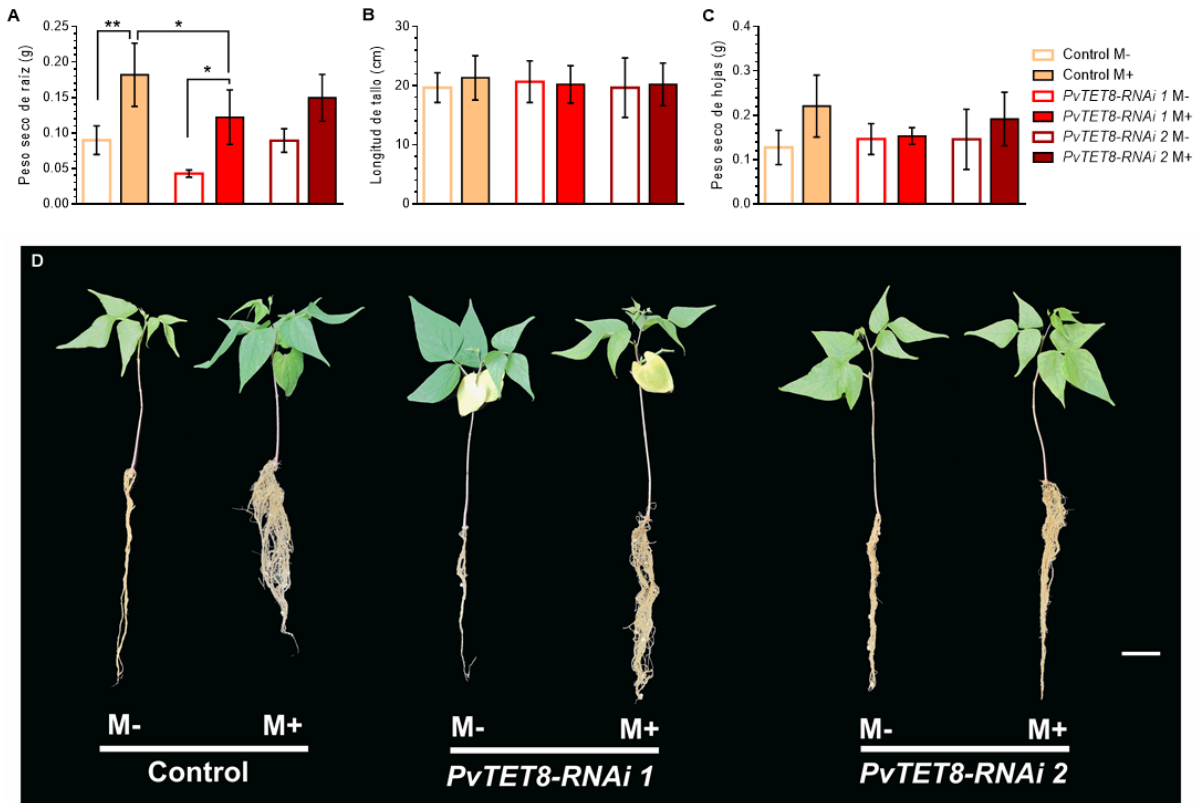


Figura 31. Parámetros de crecimiento de plantas compuestas transformadas con los vectores *pTDT-RNAi* (control), *PvTET8-RNAi 1* y *PvTET8-RNAi 2*, inoculadas (M+; barras llenas) y no inoculadas (M-; barras vacías) con *R. irregularis* (30 dpi). (A) Peso seco de raíz. (B) Longitud de tallo. (C) Peso seco de hojas. Los datos corresponden a dos experimentos independientes ($n=10$ plantas). Se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey para identificar cambios significativos (*: $P\leq 0.05$ y **: $P\leq 0.01$). Las barras de error representan la SD. (D) Imágenes representativas de plantas compuestas inoculadas (M+) o no (M-) con *R. irregularis* (30 dpi). La barra de escala corresponde a 5 cm.

La sobreexpresión y el silenciamiento del gen *PvTET8* afectan al nivel local del superóxido en las raíces de *P. vulgaris*

Considerando la importancia funcional de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en la fisiología de las plantas y en el desarrollo de la micorrización y la nodulación, se evaluó la producción de superóxido en las raíces transformadas de las líneas de sobreexpresión y silenciamiento del gen *PvTET8*. A través de la tinción con NBT, se observó que las raíces transformadas con las construcciones *35S::PvTET8 1* y *35S::PvTET8 2* tuvieron alterada la producción de superóxido a lo largo de toda la raíz y pelos radicales (Figura 32 B-D) a diferencia de las raíces control, en las que la tinción se localizó únicamente en los meristemos apicales (Figura 32A). Por su parte, en las líneas de silenciamiento *PvTET8-RNAi 1* y

PvTET8-RNAi 2, se observó una reducida producción de superóxido en los meristemos apicales de las raíces (Figura 33 B y C) en comparación con el control (Figura 33A).

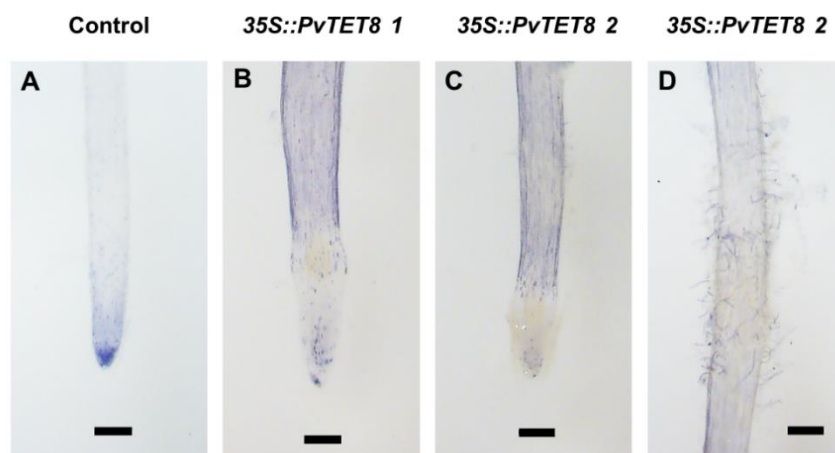


Figura 32. Análisis de producción de superóxido en raíces de 15 días de edad transformadas con los vectores 35S::GFP (A; control), 35S::PvTET8 1 (B) y 35S::PvTET8 2 (C y D). Imágenes representativas de dos experimentos independientes ($n=6$). Se realizó la tinción con NBT para revelar el precipitado de formazán (azul) producido por la reacción con superóxido. Las imágenes se capturaron con un estereoscopio con un aumento de 56x; las barras de escala corresponden a 0.2 mm.

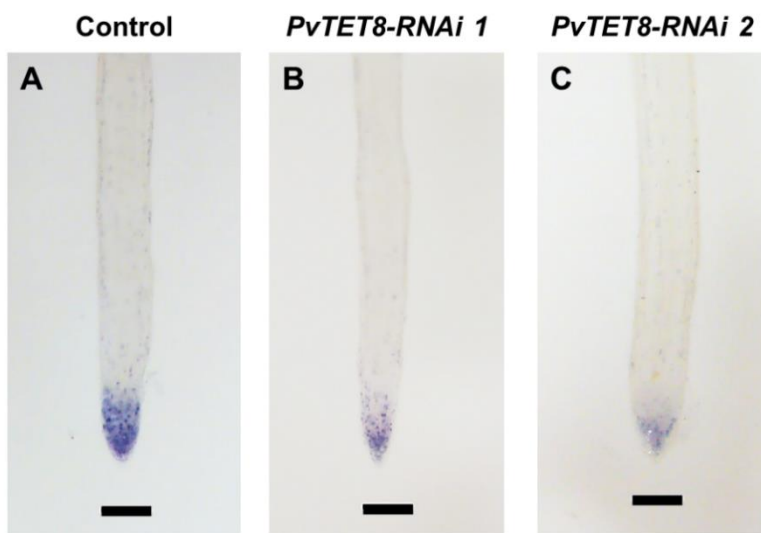


Figura 33. Análisis de producción de superóxido en raíces de 15 días de edad transformadas con los vectores pTDT-RNAi (A; control), PvTET8-RNAi 1 (B) y PvTET8-RNAi 2 (C). Imágenes representativas de dos experimentos independientes ($n=6$). Se realizó la tinción con NBT para revelar el precipitado de formazán (azul) producido por la reacción con superóxido. Las imágenes se capturaron con un estereoscopio con un aumento de 56x; las barras de escala corresponden a 0.2 mm.

DISCUSIÓN

Las tetraspaninas destacan por ser proteínas transmembranales que compartimentalizan a la membrana a través de la formación de microdominios y reclutan a otras proteínas o interactores en una región particular (Hemler, 2005; Reimann *et al.*, 2017). Estas propiedades les permiten estar involucradas en diversos procesos celulares como el tráfico de membrana intracelular, la señalización, la comunicación y la fusión celular (Hemler, 2003). La mayoría de la información que se conoce sobre estas proteínas se ha obtenido de células animales, y el conocimiento sobre el funcionamiento de las tetraspaninas en plantas es aún escaso, especialmente en las interacciones simbióticas, por lo que de ahí derivó el interés en estudiarlas. Los resultados muestran que dentro de las tetraspaninas de la leguminosa *P. vulgaris*, PvTET8 junto con su homóloga PvTET7, son proteínas ortólogas a AtTET8 y AtTET9 de *Arabidopsis*, las cuales están implicadas en la formación de exosomas que regulan la comunicación inter-reinos para inhibir la infección de un hongo patógeno (Cai *et al.*, 2018). Asimismo, la estructura genética de los miembros de este grupo monofilético conservan la misma organización de exones e intrones, por lo que se sugiere una similitud de origen y quizá funcional (García-España *et al.*, 2009). De acuerdo con Wang y colaboradores (2012), en *Arabidopsis*, la familia génica de las tetraspaninas está conformada por diferentes clados, con la mayoría de los miembros duplicados o triplicados, lo que frecuentemente resulta en redundancia funcional (Wang *et al.*, 2015). Con esto, resulta interesante investigar si PvTET8 participa en la biogénesis de exosomas al igual que AtTET8, y si PvTET7 también participa en este proceso.

Aquí se encontró que la proteína PvTET8:GFP se localiza en la membrana plasmática y en vesículas citoplasmáticas, sin embargo, se requiere determinar la localización subcelular en otro sistema o usar marcadores de estructuras subcelulares para corroborar la localización. Otros estudios han observado que las tetraspaninas, además de encontrarse en las membranas plasmáticas, se acumulan en el retículo endoplásmico, en endosomas tardíos, en lisosomas y en varias vesículas intracelulares (Albers *et al.*, 2016; Berditchevski y Odintsova, 1999; Boavida *et al.*, 2013; Hemler, 2003). En células animales, se ha reportado que las tetraspaninas interactúan con gangliósidos y esteroides para formar a los TEM, los cuales inducen la curvatura de la membrana que resulta crucial en la liberación de los exosomas (Liu *et al.*, 2020). En *Arabidopsis*, se ha encontrado una abundante cantidad de AtTET8 en fracciones de membrana plasmática y en vesículas extracelulares; además

AtTET8 resulta ser un elemento esencial para la biogénesis de exosomas (Cai *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). De hecho, se ha mostrado que AtTET8 es capaz de mediar la formación de vesículas en las plantas, ya que la mutante de *tet8* libera aproximadamente 40% menos vesículas extracelulares que las plantas de tipo silvestre (Liu *et al.*, 2020). AtTET8 también se ha localizado en los ápices de los tubos polínicos (Boavida *et al.*, 2013). De manera similar, en el presente estudio se observó que PvTET8:GFP se concentra en la región apical de los pelos radicales en crecimiento. Ambas regiones son consideradas como los sitios más activos de secreción de los componentes que forman a la nueva membrana y a la pared celular. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que PvTET8, además de ser una proteína transmembranal, podría mediar la formación de vesículas y podría estar implicada en el crecimiento polarizado de los pelos radicales.

Al igual que en el crecimiento del tubo polínico y los pelos radicales, en el establecimiento de la nodulación y la micorrización se requiere de una deposición polarizada de las membranas endosimbióticas a medida que los rizobios y las hifas de los AMF ingresan a las células vegetales, ya que ambos microorganismos simbiotes siempre están contenidos o envueltos en membranas de origen vegetal (Genre *et al.*, 2012; Harrison y Ivanov, 2017; Huisman *et al.*, 2016; Ivanov *et al.*, 2012; Limpens *et al.*, 2009). Dado que la generación de nuevas membranas involucra a la vía secretora, no es de extrañar que varios de los componentes moleculares requeridos para el tráfico vesicular y la fusión de membranas, como las tetraspaninas, tengan una participación activa en el desarrollo de estas interacciones mutualistas (Liu *et al.*, 2021; Roy *et al.*, 2019). Por lo tanto, resultó de gran interés estudiar si PvTET8 es un componente fundamental para el establecimiento y el desarrollo de la nodulación y la micorrización.

En primera instancia, con la observación de la actividad del promotor del gen *PvTET8* en las células del córtex interno de raíces micorrizadas, se estimó que el producto de dicho gen se podría requerir en la asociación micorrícica, especialmente en los sitios del desarrollo arbuscular. Además, con el análisis *in silico*, se sugiere que *PvTET8* podría estar vinculada con la adquisición de fosfato, ya que varios elementos de regulación presentes en diversos promotores de los transportadores de fosfato se encontraron en el promotor del gen *PvTET8*, como son el elemento *ARR1AT*, que en *O. sativa* promueve la expresión de los genes para los transportadores de fosfato ante la inoculación con un hongo micorrícico. También se encontró el motivo *G-Box* que se ha localizado en los promotores de *OsPT4* y *OsPT11*, y el

motivo *WRKY71OS*, que se presenta en todos los promotores de los transportadores de fosfato de *O. sativa* (Chen *et al.*, 2011; Hatorangan *et al.*, 2009). Además, el motivo *WRKY71OS* es un sitio de unión del represor transcripcional *WRKY71* de la vía de señalización de las giberelinas (Zhang *et al.*, 2004). En este sentido, se ha descrito que las giberelinas regulan negativamente a la micorrización arbuscular. Los altos niveles de fosfato inorgánico (Pi) estimulan la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ácido giberélico, el cual suprime y afecta la formación de arbusculos mediante la degradación de *DELLA* (Choi *et al.*, 2018; Foo *et al.*, 2013). De esta manera, se sugiere que *WRKY71OS* podría ser un elemento de regulación positiva de la micorrización, mediante la inhibición del ácido giberélico. Otro de los elementos destacados contenidos en el promotor del gen *PvTET8* fueron *NODCON1GM* y *NODCON2GM*, que se han descrito como secuencias consenso de los promotores de las leghemoglobinas y de algunas nodulinas (Fehlberg *et al.*, 2005; Stougaard *et al.*, 1990). Además, estos motivos también se requieren para la formación de los arbusculos micorrícicos, tanto en plantas leguminosas como no leguminosas (Fehlberg *et al.*, 2005; Vieweg *et al.*, 2004). Por lo tanto, la presencia de estos motivos en el promotor del gen *PvTET8* sirve para explicar por qué su producto es activo tanto en la nodulación (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2019b), como en la micorrización arbuscular.

También, se encontró que la alteración de la expresión del gen *PvTET8* afectó sensiblemente tanto la nodulación como la micorrización. Las líneas de sobreexpresión de *PvTET8* generaron un incremento en el número de nódulos, mientras que su silenciamiento resultó en el efecto opuesto, es decir, una reducida cantidad de nódulos. Al analizar la colonización de *R. tropici* fluorescentes en los nódulos, se pudo observar una señal mayoritariamente distribuida en los nódulos sobreexpresantes, mientras que en los nódulos de plantas donde la expresión del gen fue silenciada, difícilmente se logró percibir señal de los rizobios; además, en donde no se detectó expresión del ARN interferente, se distinguió una notoria colonización de los rizobios. El silenciamiento del gen *PvTET8* también provocó una disminución en la frecuencia de arbusculos, lo que podría indicar una micorrización no exitosa. En su lugar, se encontró un incremento de sitios de infección y apresorios en tiempos tardíos (30 dpi), lo cual no es normal si la micorrización es eficiente. En el caso de la sobreexpresión del gen *PvTET8*, la colonización de arbusculos aumentó respecto a su control, mientras que la frecuencia de las otras estructuras micorrícicas no fue alterada. Con base en estos datos, se sugiere que *PvTET8* participa en la colonización de *R. tropici* y de

R. irregularis, posiblemente generando más eventos de infección exitosos durante la nodulación y favoreciendo a la formación de arbúsculos.

Probablemente, *PvTET8* mediante la regulación del tráfico vesicular y la biogénesis de exosomas, pueda suministrar material para la formación de nuevas membranas, proteínas y moléculas señal que mejoren la comunicación celular y la introducción del simbionte a las raíces. En este sentido, en los hilos de infección en crecimiento, en el aparato de prepenetración y en los sitios de ramificación de las hifas micorrícicas, se han encontrado organelos de secreción, estructuras vesiculares y proteínas implicadas en la fusión de membranas, como *SYP132*, *VAMP721d/e*, *EXPO70i* y *VAPYRIN* (Fournier *et al.*, 2015; Genre *et al.*, 2012; Ivanov *et al.*, 2019, 2012; Robertson *et al.*, 1978). De hecho, la pérdida de función de dichas proteínas afecta al desarrollo de los compartimentos simbióticos y, por lo tanto, a la asociación simbiótica (Huisman *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2016; Roth *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2015). De esta manera, se sugiere que la sobreexpresión del gen *PvTET8* podría facilitar la entrada y la colonización de los microsimbiontes a través de una secreción vesicular acelerada y eficiente, necesaria para la remodelación de la pared celular y la comunicación inter-reinos. Por su parte, la disminución de expresión de *PvTET8*, puede repercutir en el tráfico de membranas.

La reducida colonización de rizobios dentro de los nódulos en las líneas de silenciamiento del gen *PvTET8*, también se puede deber a que se encuentren afectadas la liberación de los rizobios del hilo de infección y la formación de los simbiosomas. En este sentido, se ha observado que al mutar proteínas implicadas en el reconocimiento y la fusión de vesículas, se puede afectar la liberación de las gotas de infección y la maduración de los bacteroides (Gavrin *et al.*, 2016; Huisman *et al.*, 2016; Ivanov *et al.*, 2012). Además, las membranas de los simbiosomas se han relacionado estrechamente con la PAM por ser similares en función y formación. Por lo tanto, la ausencia de algunas proteínas implicadas en el tráfico vesicular causan una disrupción en la formación de ambas membranas simbióticas (Huisman *et al.*, 2016; Ivanov *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2016).

Por otro lado, al analizar la actividad de la nitrogenasa se reveló que tanto las líneas de sobreexpresión como las de silenciamiento tienen una capacidad reductora disminuida. En el caso de los nódulos con silenciamiento del gen *PvTET8*, esta reducida actividad se puede deber a una menor cantidad de bacteroides y/o a una alteración en la formación y la madurez de las células especializadas del nódulo, lo cual impide establecer el ambiente

hipóxico idóneo para la enzima. En este sentido, los nódulos silenciados tuvieron una coloración blanquizca, sugiriendo la ausencia de la leghemoglobina necesaria para el secuestro del oxígeno y la correcta funcionalidad de la nitrogenasa (Ott *et al.*, 2005). De manera contraria, en las líneas sobreexpresantes del gen *PvTET8*, aunque la actividad de la enzima a los 21 dpi fue menor, los nódulos mostraron una intensa tonalidad rosa, y la biomasa del tejido fotosintético de estas plantas se incrementó en 89% con respecto al control. Esto sugiere que la fijación del nitrógeno no fue afectada, sino que la sobreexpresión del gen *PvTET8* además de incrementar la infección de *R. tropici*, aceleró el establecimiento de la nodulación. De esta manera, los nódulos evaluados en vez de estar en un estado óptimo de fijación (21 dpi), podrían estar en senescencia, es decir, en una etapa en la cual disminuye la reducción del nitrógeno atmosférico. Otra posibilidad es que la sobreexpresión del gen *PvTET8* altere a la diferenciación de las células del nódulo, perturbando a la actividad de la nitrogenasa. Para discernir entre estas posibilidades, se requiere hacer cortes histológicos de los nódulos en diferentes etapas del desarrollo, a fin de determinar si la sobreexpresión y el silenciamiento del gen *PvTET8* afectan la liberación de las bacterias, la formación de los simbiosomas, la madurez de los bacteroides y la diferenciación de las células del nódulo.

De manera similar al bajo funcionamiento fisiológico de la nitrogenasa en la nodulación, el silenciamiento del gen *PvTET8* disminuyó los niveles de expresión del transportador de fosfato *PvPT4*. Este transportador, homólogo a *MtPT4* de *M. truncatula*, se induce durante la micorrización arbuscular (Arthikala *et al.*, 2013), por lo que se le ha considerado como un gen marcador para las células que contienen arbusculos. Algunos estudios han revelado que la secreción polarizada dirigida hacia las ramas finas de los arbusculos, es fundamental para proporcionar los transportadores y los componentes necesarios para la formación de la PAM, permitiendo el desarrollo del arbusculo y el mantenimiento de la simbiosis (Huisman *et al.*, 2016; Ivanov *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015). En este sentido, se sugiere que el silenciamiento del gen *PvTET8* afecta al tráfico vesicular polarizado, lo que repercute negativamente en la expresión de *PvPT4*. Caso contrario a la sobreexpresión del gen *PvTET8*, en donde se aumentó hasta nueve veces la acumulación del transcrito de *PvPT4* con respecto a su control. Entonces, si se relaciona la presencia de *PvPT4* con el suministro de fosfato a las plantas, se puede sugerir que la sobreexpresión del gen *PvTET8* mejora considerablemente a la micorrización arbuscular, posiblemente a través de la biogénesis de la PAM y el suministro de distintos transportadores a esta membrana. Aunque no se evaluó el nivel de fosfato de las plantas, el

incremento aproximado del 50% del peso seco de las hojas en las plantas compuestas sobreexpresantes de *PvTET8* colonizadas con *R. irregularis*, sugiere que estos organismos tuvieron un mejor crecimiento inducido por una micorrización más exitosa y eficiente. En este sentido, algunos trabajos han mostrado que la micorrización arbuscular aumenta la fotosíntesis, el crecimiento de la planta y la biomasa vegetal (Bago *et al.*, 2000; Poza-Carrión y Paz-Ares, 2019).

Además de los diversos cambios observados, en las raíces sobreexpresantes del gen *PvTET8*, los nódulos mostraron un aumento en el peso seco y el tamaño, mientras que, en los nódulos de las raíces silenciadas, estos parámetros disminuyeron respecto a su control. Con estos resultados se sugiere que *PvTET8* participa en la organogénesis y/o el crecimiento del nódulo. Algunas tetraspaninas evaluadas en *Arabidopsis* han mostrado funciones en la proliferación celular de raíces y hojas (*AtTET5* y *AtTET6*), en la morfogénesis de la hoja (*AtTET1*) y en la regulación del tamaño del meristemo apical, la longitud de la raíz y la formación de raíces laterales (*AtTET13*; Cnops *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015). Incluso se ha encontrado que *AtTET9*, miembro del grupo monofilético TET7/8/9, incrementa la eficiencia de la respuesta de auxinas, controlando directa o indirectamente la actividad del ácido jasmónico y los procesos del desarrollo de la planta (Chen *et al.*, 2019). En este sentido, *TET9*, también denominada como *Auxin Activation Factor* (AAF), regula el tamaño de los órganos en dos géneros de orquídeas y en *Arabidopsis*; así, el gen de esta tetraspanina se expresa en mayores niveles en órganos de mayor tamaño y durante la formación de estructuras florales (Chen *et al.*, 2019). Además, la expresión ectópica del gen *AtTET9* generó flores, silicuas y semillas más grandes, sin afectar al número de células; mientras que la mutación de este gen disminuyó el tamaño de los mismos órganos, lo cual sugiere que esta tetraspanina promueve la expansión celular a través de la regulación de auxinas (Chen *et al.*, 2019). Asimismo, las auxinas controlan el ciclo celular de los meristemas de los nódulos, la diferenciación del tejido vascular y la infección rizobial durante la nodulación (Kohlen *et al.*, 2018). Por lo tanto, considerando que *PvTET8* y *AtTET9* forman parte del mismo grupo monofilético, y que el promotor del gen *PvTET8* es activo en los meristemas de raíz y nódulos, es posible considerar que *PvTET8* regule la expansión o la división celular de los nódulos, a través de las respuestas a auxinas.

Además del posible papel de *PvTET8* en la regulación de auxinas y la biogénesis de exosomas, esta tetraspanina, a través de la formación de TEM, también puede reclutar

proteínas claves para la señalización celular, como las NADPH oxidasas (RBOH). La desregulada localización de superóxido a causa de la sobreexpresión del gen *PvTET8*, junto con la reducción en la producción de superóxido en los meristemos de las raíces silenciadas, permite sugerir que esta tetraspanina está involucrada en la distribución y la organización de las NADPH oxidasas. Incluso la expresión del gen *PvTET8* y la localización de la proteína PvTET8:GFP en sitios que requieren de la producción de ERO (meristemos y ápices de pelos radicales; Mangano *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2020), podría indicar una correlación de PvTET8 con la generación de este tipo de moléculas. De hecho, en otros sistemas biológicos se ha observado una correlación entre el funcionamiento de las tetraspaninas con las NADPH oxidasas. En nematodos, la interacción de la tetraspanina TSP-15 con una NADPH oxidasa, se requiere para la formación de su cutícula (Edens *et al.*, 2001). En hongos patógenos, como *Magnaporthe grisea* y *Botrytis cinérea*, así como en hongos saprobios como *Podospora anserina*, se sugiere que las NADPH oxidasas interactúan con la tetraspanina Pls1, para formar una maquinaria molecular especializada requerida en la penetración mediada por el apresorio (en patógenos), así como para la germinación de la ascospora y la degradación de polímeros naturales de carbono (en hongos no patógenos; Lambou *et al.*, 2008; Malagnac *et al.*, 2008; Siegmund *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, la NADPH oxidasa relacionada a la defensa (RbohB) se puede localizar en microdominios membranales de los cuales AtTET8 regula su biosíntesis y homeostasis, por lo que se ha sugerido que AtTET8 es requerida para la producción de ERO (Nagano *et al.*, 2016). Como consecuencia, en la mutante *tet8* está afectada negativamente la producción de ERO, tanto en condiciones de crecimiento normal, como en respuesta a elicitores de estrés biótico (Liu *et al.*, 2020).

Las ERO también tienen un papel importante en la señalización inducida por los Factores Nod y Myc, ya que son requeridas para el remodelamiento de la pared celular y para la reorganización del citoesqueleto que mantiene el desarrollo del hilo de infección y del aparato de prepenetración micorrízica (Belmondo *et al.*, 2016; Montiel *et al.*, 2012). De hecho, la sobreexpresión del gen *PvRbohB* promueve la nodulación y afecta la micorrización arbuscular, mientras que el silenciamiento de *MtRbohE* afecta a la formación de arbusculos. Por lo tanto, se ha sugerido que diferentes genes de los miembros de la familia RBOH tienen distintas funciones en ambas simbiosis (Arthikala *et al.*, 2017; Arthikala *et al.*, 2013; Belmondo *et al.*, 2016; Cárdenas *et al.*, 2014). De esta forma, se puede sugerir que el silenciamiento del gen *PvTET8*, a través de la interrupción de la formación de TEM podría

afectar al reclutamiento y/o a la organización de NADPH oxidasas indispensables para el establecimiento de la nodulación y la micorrización.

Finalmente, los resultados de este trabajo contribuyen a comprender las funciones de las tetraspaninas en las interacciones mutualistas, permitiendo relacionarlas con la comunicación planta-microorganismo en diferentes aspectos de la simbiosis, desde las etapas iniciales, que permiten la colonización, hasta el funcionamiento de las estructuras simbióticas. Aunque se resaltaron algunos mecanismos en donde PvTET8 puede estar implicada, aún hace falta realizar estudios más detallados de cada uno de estos procesos.

CONCLUSIONES

- La tetraspanina PvTET8 se localiza en la membrana plasmática y en cuerpos vesiculares intracelulares con una posible participación en el crecimiento polarizado.
- La mayor expresión del gen *PvTET8* ocurre durante el desarrollo y/o funcionamiento de los arbusculos.
- La tetraspanina PvTET8 tiene un papel fundamental en la nodulación durante la colonización de rizobios, la organogénesis y la maduración del nódulo, así como en la micorrización durante la formación de arbusculos.
- Los mecanismos en los cuales PvTET8 puede ser requerida para el establecimiento de las interacciones mutualistas son: la biogénesis de vesículas, la secreción polarizada, la fusión de membranas, el suministro de transportadores de nutrientes, la expansión y la división celular a través de la regulación de auxinas, así como la organización de TEM para reclutar enzimas indispensables, tales como las NADPH oxidasas, en regiones de la membrana plasmática.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la naturaleza de las vesículas marcadas con PvTET8-GFP mediante marcadores de estructuras subcelulares, para determinar si esta tetraspanina está implicada en la biogénesis de los exosomas en *P. vulgaris*.
- Purificar vesículas marcadas con PvTET8-GFP y analizar sus cargos para determinar si están implicados en el establecimiento de la nodulación y la micorrización.
- Realizar cortes histológicos de nódulos en diferentes etapas del desarrollo, para determinar si el silenciamiento y la sobreexpresión del gen *PvTET8* alteran la infección y la morfogénesis del nódulo.
- Evaluar los fenotipos de silenciamiento y sobreexpresión del gen *PvTET8* en etapas más tempranas y tardías de nodulación y micorrización, para tener un panorama más completo del papel de PvTET8 en esos procesos.

REFERENCIAS

- Abdel-Lateif, K., Bogusz, D., y Hocher, V. (2012). The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signaling and Behavior*, 7(6), 636–641. <https://doi.org/10.4161/psb.20039>
- Albers, T., Maniak, M., Beitz, E., y Von Bölow, J. (2016). The C isoform of dictyostelium tetraspanins localizes to the contractile vacuole and contributes to resistance against osmotic stress. *PLoS ONE*, 11(9), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162065>
- Alexander, T., Toth, R., Meier, R., y Weber, H. C. (1989). Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, and tomato with reference to vesicular–arbuscular mycorrhizae in grasses. *Canadian Journal of Botany*, 67(8), 2505–2513. <https://doi.org/10.1139/b89-320>
- An, Q., Ehlers, K., Kogel, K. H., van Bel, A. J. E., y Hüchelhoven, R. (2006). Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytologist*, 172, 563–576. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01844.x>
- Andreu, Z., y Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>
- Andrews, M., y Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(705), 1–39. <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Arthikala, M. K., Montiel, J., Nava, N., Santana, O., Sánchez-López, R., Cárdenas, L., y Quinto, C. (2013). PvRbohB negatively regulates Rhizophagus irregularis colonization in Phaseolus vulgaris. *Plant and Cell Physiology*, 54(8), 1391–1402. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct089>
- Arthikala, M. K., Montiel, J., Sánchez-López, R., Nava, N., Cárdenas, L., y Quinto, C. (2017). Respiratory Burst Oxidase Homolog Gene A Is Crucial for Rhizobium Infection and Nodule Maturation and Function in Common Bean. *Frontiers in Plant Science*,

- 8(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02003>
- Bago, B., Pfeffer, P. E., y Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124, 949–957.
- Baldrich, P., Rutter, B. D., Karimi, H. Z., Podicheti, R., Meyers, B. C., y Innes, R. W. (2019). Plant Extracellular Vesicles Contain Diverse Small RNA Species and Are Enriched in 10- to 17- Nucleotide “Tiny” RNAs. *The Plant Cell*, 31, 315–324. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00872>
- Belmondo, S., Calcagno, C., Genre, A., Puppo, A., Pauly, N., y Lanfranco, L. (2016). NADPH oxidases in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Signaling and Behavior*, 11(4), 1–4. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1165379>
- Berditchevski, F., y Odintsova, E. (1999). Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: Role of tetraspanins in integrin signaling. *Journal of Cell Biology*, 146(2), 477–492. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.2.477>
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., ... Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4(7), 1239–1247. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226>
- Boavida, L. C., Qin, P., Broz, M., Becker, J. D., y McCormick, S. (2013). Arabidopsis tetraspanins are confined to discrete expression domains and cell types in reproductive tissues and form homo and heterodimers when expressed in yeast. *Plant Physiology*, 163(2), 696–712. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216598>
- Bonfante, P., y Genre, A. (2015). Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak “plantish” or “fungish”? *Trends in Plant Science*, 20(3), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.002>
- Cai, Q., He, B., y Jin, H. (2019). A safe ride in extracellular vesicles – small RNA trafficking between plant hosts and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 52, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.001>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.-M., Palmquist, J., y Jin, H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360(6393), 1126–1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>
- Cárdenas, L., Santana, O., Nava, N., Quinto, C., Arthikala, M.-K., y Sánchez-López, R. (2014). RbohB , a Phaseolus vulgaris NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization . *New Phytologist*, 202(3), 886–900. <https://doi.org/10.1111/nph.12714>
- Catalano, C. M., Czymmek, K. J., Gann, J. G., y Sherrier, D. J. (2007). Medicago truncatula syntaxin SYP132 defines the symbiosome membrane and infection droplet membrane in root nodules. *Planta*, 225, 541–550. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0369-y>
- Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C., y Rubinstein, E. (2014). Tetraspanins at a glance. *Journal of Cell Science*, 127, 3641–3648. <https://doi.org/10.1242/jcs.154906>
- Chen, A., Gu, M., Sun, S., Zhu, L., Hong, S., y Xu, G. (2011). Identification of two conserved cis-acting elements, MYCS and P1BS, involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species. *New Phytologist*, 189(4), 1157–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03556.x>
- Chen, W. H., Hsu, W. H., Hsu, H. F., y Yang, C. H. (2019). A tetraspanin gene regulating auxin response and affecting orchid perianth size and various plant developmental processes. *Plant Direct*, 3(8), 1–20. <https://doi.org/10.1002/pld3.157>
- Cho, J. A., Park, H., Lim, E. H., y Lee, K. W. (2012). Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue- derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *International Journal of Oncology*, 40, 130–138. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1193>

- Choi, J., Summers, W., y Paszkowski, U. (2018). Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 135–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035521>
- Cnops, G., Neyt, P., Raes, J., Petrarulo, M., Nelissen, H., Malenica, N., ... Van Lijsebettens, M. (2006). The TORNADO1 and TORNADO2 genes function in several patterning processes during early leaf development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 18(4), 852–866. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040568>
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., y Bono, J. J. (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science*, 6(1), 24–30. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01810-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01810-0)
- Delaux, P.-M., Séjalon-Delmas, N., Bécard, G., y Ané, J.-M. (2013). Evolution of the plant–microbe symbiotic ‘toolkit’. *Trends in Plant Science*, 18(6), 298–304. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.008>
- Edens, W. A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J. M., Lee, T., ... David Lambeth, J. (2001). Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *Journal of Cell Biology*, 154(4), 879–891. <https://doi.org/10.1083/jcb.200103132>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., ... Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature protocols*, 2(7), 1819–1824. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.259>
- Fahraeus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of general microbiology*, 16(2), 374–381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>
- Fehlberg, V., Vieweg, M. F., Dohmann, E. M. N., Hohnjec, N., Pühler, A., Perlick, A. M., y Küster, H. (2005). The promoter of the leghaemoglobin gene Vflb29: Functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *Journal of Experimental Botany*, 56(413), 799–806. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri074>
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., y 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>
- Finlay, R. D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1115–1126. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern059>
- Fisher, R. A. (1925). *Statistical Methods for Research Workers*. Edinburgh: Oliver y Boyd.
- Fliegmann, J., y Bono, J. J. (2015). Lipo-chitooligosaccharidic nodulation factors and their perception by plant receptors. *Glycoconjugate Journal*, 32(7), 455–464. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9609-3>
- Florin, L., y Lang, T. (2018). Tetraspanin assemblies in virus infection. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01140>
- Foo, E., Ross, J., Jones, W., y Reid, J. (2013). Plant hormones in arbuscular mycorrhizal symbioses: An emerging role for gibberellins. *Annals of Botany*, 111(5), 769–779. <https://doi.org/10.1093/aob/mct041>

- Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., ... Barker, D. G. (2015). Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiology*, 167, 1233–1242. <https://doi.org/10.1104/pp.114.253302>
- Fournier, J., Timmers, A. C. J., Sieberer, B. J., Jauneau, A., Chabaud, M., y Barker, D. G. (2008). Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology*, 148, 1985–1995. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125674>
- García-España, A., Mares, R., Sun, T. T., y DeSalle, R. (2009). Intron evolution: Testing hypotheses of intron evolution using the phylogenomics of tetraspanins. *PLoS ONE*, 4(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004680>
- Gavrin, A., Chiasson, D., Ovchinnikova, E., Kaiser, B. N., Bisseling, T., y Fedorova, E. E. (2016). VAMP721a and VAMP721d are important for pectin dynamics and release of bacteria in soybean nodules. *New Phytologist*, 210, 1011–1021. <https://doi.org/10.1111/nph.13837>
- Genre, A., Ivanov, S., Fendrych, M., Faccio, A., Žárský, V., Bisseling, T., y Bonfante, P. (2012). Multiple Exocytotic Markers Accumulate at the Sites of Perifungal Membrane Biogenesis in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant and Cell Physiology*, 53(1), 244–255. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr170>
- Genre, Andrea, Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G., y Bonfante, P. (2008). Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell*, 20, 1407–1420. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059014>
- Geurts, R., Xiao, T. T., y Reinhold-Hurek, B. (2016). What does it take to evolve a nitrogen-fixing endosymbiosis? *Trends in Plant Science*, 21(3), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.012>
- Giovannetti, M., y Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489–500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- Girardin, A., Wang, T., Ding, Y., Keller, J., Buendia, L., Gaston, M., ... Lefebvre, B. (2019). LCO Receptors Involved in Arbuscular Mycorrhiza Are Functional for Rhizobia Perception in Legumes. *Current Biology*, 29(24), 4249–4259.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.038>
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., ... Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(Database), 1178–1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
- Grellet, C., y Díaz-Ricci, J. (2011). Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. *Phytochemical Analysis*, 22(3), 268–271. <https://doi.org/10.1002/pca.1275>
- Gu, Y., Zavaliev, R., y Dong, X. (2017). Membrane trafficking in plant immunity. *Molecular Plant*, 10, 1026–1034. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.001>
- Hansen, L. L., y Nielsen, M. E. (2018). Plant exosomes: using an unconventional exit to prevent pathogen entry? *Journal of Experimental Botany*, 69(1), 59–68. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx319>
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R., y Liu, J. (2002). A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell*, 14(October), 2413–2429. <https://doi.org/10.1105/tpc.004861>
- Harrison, M. J., y Ivanov, S. (2017). Exocytosis for endosymbiosis: membrane trafficking pathways for development of symbiotic membrane compartments. *Current Opinion in*

- Plant Biology*, 38, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.019>
- Hatorangan, M. R., Sentausa, E., y Wijaya, G. Y. (2009). In silico identification of cis-regulatory elements of phosphate transporter genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12(1), 25–30. <https://doi.org/10.1007/s12892-008-0054-8>
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin Proteins Mediate Cellular Penetration, Invasion, and Fusion Events and Define a Novel Type of Membrane Microdomain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 397–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609>
- Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 801–811. <https://doi.org/10.1038/nrm1736>
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., y Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 297–300. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.297>
- Hoagland, D., y Arnon, D. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, 347, 1–32.
- Huang, S., Yuan, S., Dong, M., Su, J., Yu, C., Shen, Y., ... Xu, A. (2005). The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics*, 86(6), 674–684. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.08.004>
- Huisman, R., Hontelez, J., Mysore, K. S., Wen, J., Bisseling, T., y Limpens, E. (2016). A symbiosis-dedicated SYNTAXIN OF PLANTS 13II isoform controls the formation of a stable host – microbe interface in symbiosis. *New Phytologist*, 211, 1338–1351.
- Hurwitz, S. N., Conlon, M. M., Rider, M. A., Brownstein, N. C., y Meckes, D. G. (2016). Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5, 1–20. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31295>
- Invitrogen. Life Technologies Corporation. (2012). pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits.
- Ivanov, S., Austin II, J., Berg, R. H., y Harrison, M. J. (2019). Extensive membrane systems at the host–arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nature Plants*, 5, 194–203. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0364-5>
- Ivanov, S., Fedorova, E. E., Limpens, E., Mita, S. De, Genre, A., y Bonfante, P. (2012). Rhizobium – legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *PNAS*, 109(2), 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1200407109>
- Javot, Helene, Penmetsa, R. V., Terzaghi, N., Cook, D. R., y Harrison, M. J. (2007). A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS*, 104(5), 1720–1725.
- Javot, Hélène, Penmetsa, V., Breuillin, F., Bhattarai, K., Noar, R., Gomez, S. K., ... Harrison, M. (2011). *Medicago truncatula* mtpt4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal*, 68, 954–965. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04746.x>
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4), 387–405. <https://doi.org/10.1007/BF02667740>
- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., ... Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>
- Jimenez-Jimenez, S., Hashimoto, K., Santana, O., Aguirre, J., Kuchitsu, K., y Cárdenas, L. (2019). Emerging roles of tetraspanins in plant inter-cellular and inter-kingdom communication. *Plant Signaling y Behavior*, 14(4), e15815591-11.

- <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1581559>
- Jimenez-Jimenez, S., Santana, O., Lara-Rojas, F., Arthikala, M., Armada, E., Hashimoto, K., ... Cárdenas, L. (2019). Differential tetraspanin genes expression and subcellular localization during mutualistic interactions in *Phaseolus vulgaris*. *PLOS ONE*, *14*(8), 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219765>
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., y Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(8), 619–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1705>
- Karban, R. (2015). Microbes and Plant Communication. En *Plant Sensing and Communication*. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226264844.001.0001>
- Karimi, M., Inzé, D., y Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, *7*(5), 193–195. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Kaufmann, J., y Schering, A. (2014). Analysis of Variance ANOVA. En *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (pp. 1–12). <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat06938>
- Keener, A. (2019). Exosomes make their debut in plant research. *The Scientist*. Recuperado de <https://www.the-scientist.com/features/exosomes-make-their-debut-in-plant-research-65336>
- Kistner, C., y Parniske, M. (2002). Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *TRENDS in Plant Science*, *7*(11), 511–518. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02356-7](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02356-7)
- Kistner, C., Winzer, T., Pitzschke, A., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., ... Parniske, M. (2005). Seven Lotus japonicus genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell*, *17*(8), 2217–2229. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032714>
- Kohlen, W., Pin Ng, J. L., Deinum, E. E., y Mathesius, U. (2018). Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 229–244. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx308>
- Koske, R., y Gemma, J. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, *92*(4), 486–488. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80195-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80195-9)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y 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>
- Lambou, K., Tharreau, D., Kohler, A., Sirven, C., Marguerettaz, M., Barbisan, C., ... Lebrun, M. H. (2008). Fungi have three tetraspanin families with distinct functions. *BMC Genomics*, *9*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-63>
- Lanfranco, L., Bonfante, P., y Genre, A. (2016). The mutualistic interaction between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiology Spectrum*, *4*(6), 1–20. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0012-2016>
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., y Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, *344*, 781–784. <https://doi.org/10.1038/344781a0>
- Li, X. (2011). Infiltration of *Nicotiana benthamiana* Protocol for Transient Expression via *Agrobacterium*. *BIO-PROTOCOL*, *1*(14). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.95>
- Limpens, E. (2019). Extracellular membranes in symbiosis. *Nature Plants*, *5*(2), 131–132. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0370-7>

- Limpens, E., Ivanov, S., Esse, W. Van, Voets, G., Fedorova, E., y Bisseling, T. (2009). Medicago N2-fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *The Plant Cell*, 21, 2811–2828. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064410>
- Liu, C. W., Breakspear, A., Stacey, N., Findlay, K., Nakashima, J., Ramakrishnan, K., ... Murray, J. D. (2019). A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nature Communications*, 10(2848), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10029-y>
- Liu, C. W., y Murray, J. D. (2016). The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update. *Plants*, 5(33), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants5030033>
- Liu, M., Jia, N., Li, X., Liu, R., Xie, Q., Murray, J. D., ... Xie, F. (2021). CERBERUS is critical for stabilization of VAPYRIN during rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *New Phytologist*, 229(3), 1684–1700. <https://doi.org/10.1111/nph.16973>
- Liu, N. J., Wang, N., Bao, J. J., Zhu, H. X., Wang, L. J., y Chen, X. Y. (2020). Lipidomic analysis reveals the importance of GIPCs in Arabidopsis leaf extracellular vesicles. *Molecular Plant*, 13, 1523–1532. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.016>
- Luginbuehl, L. H., y Oldroyd, G. E. D. (2017). Understanding the Arbuscule at the Heart of Endomycorrhizal Symbioses in Plants. *Current Biology*, 27, R952–R963. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.042>
- Maecker, H. T., Todd, S. C., y Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *The FASEB Journal*, 11(6), 428–442. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.6.9194523>
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagés, V., Haouy, A., Gueunier, M., ... Dénarié, J. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469, 58–64. <https://doi.org/10.1038/nature09622>
- Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., Brun, S., Lambou, K., Lebrun, M.-H., y Silar, P. (2008). Convergent evolution of morphogenetic processes in fungi: Role of tetraspanins and NADPH oxidases 2 in plant pathogens and saprobes. *Communicative y Integrative Biology*, 1(2), 180–181. <https://doi.org/10.4161/cib.1.2.7198>
- Mangano, S., Juárez, S. P. D., y Estevez, J. M. (2016). ROS regulation of polar growth in plant cells. *Plant Physiology*, 171, 1593–1605. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00191>
- Mani, B., Agarwal, M., y Katiyar-Agarwal, S. (2015). Comprehensive Expression Profiling of Rice Tetraspanin Genes Reveals Diverse Roles During Development and Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 6(1088), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01088>
- Mithöfer, A. (2002). Suppression of plant defence in rhizobia – legume symbiosis. *TRENDS in Plant Science*, 7(10), 440–444. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02336-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02336-1)
- Monk, P. N., y Partridge, L. J. (2012). Tetraspanins: gateways for Infection. *Infectious Disorders-Drug Targets*, 12, 4–17. <https://doi.org/10.2174/187152612798994957>
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Sánchez-López, R., Arthikala, M. K., Santana, O., ... Quinto, C. (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by Rhizobia. *Plant and Cell Physiology*, 53(10), 1751–1767. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs120>
- Murray, J. D., Liu, C. W., Chen, Y., y Miller, A. J. (2017). Nitrogen sensing in legumes. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1919–1926. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw405>
- Nagano, M., Ishikawa, T., Fujiwara, M., Fukao, Y., Kawano, Y., Kawai-Yamada, M., y Shimamoto, K. (2016). Plasma membrane microdomains are essential for Rac1-RbohB/H-mediated immunity in rice. *Plant Cell*, 28(8), 1966–1983. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00201>
- Nielsen, M. E., Feechan, A., Bohlenius, H., Ueda, T., y Thordal-Christensen, H. (2012).

- Arabidopsis ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11443–11448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117596109>
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., y Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0343-2>
- Oldroyd, G. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 252. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Ormeño-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L. E., Rogel, M. A., González, V., Peralta, H., Mora, J., ... Martínez-Romero, E. (2015). Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.002>
- Ott, T., Van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., ... 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>
- Pan, H., Oztas, O., Zhang, X., Wu, X., Stonoha, C., Wang, E., ... Wang, D. (2016). A symbiotic SNARE protein generated by alternative termination of transcription. *Nature Plants*, 2(15197), 1–5. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.197>
- Parniske, M. (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 320–328. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00088-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00088-1)
- Parniske, M. (2005). Cue for the branching connection. *Nature*, 435, 750–751. <https://doi.org/10.1038/435750a>
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Peters, N. K. (1997). Nodulation: Finding the lost common denominator. *Current Biology*, 7(4), 223–226. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00106-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00106-0)
- Poza-Carrión, C., y Paz-Ares, J. (2019). When nitrate and phosphate sensors meet. *Nature Plants*, 3–4. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0403-2>
- Quinto, C., y Cárdenas, L. (2007). Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. *Biotechnología*, 14, 273–280.
- Ramírez, M., Valderrama, B., Arredondo-Peter, R., Soberón, M., Mora, J., y Hernández, G. (1999). *Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin: Effects on free-living and symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(11), 1008–1015. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.1008>
- Redecker, D., Kodner, R., y Graham, L. E. (2000). Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science*, 289, 1920–1921. <https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1920>
- Redmond, J. W., Batley, M., Djordjevic, M. A., Innes, R. W., Kuempel, P. L., y Rolfe, B. G. (1986). Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature*, 323(16), 632–635. <https://doi.org/10.1038/323632a0>
- Regente, M., Pinedo, M., Clemente, H. S., Balliau, T., y Jamet, E. (2017). Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth. *Journal of Experimental Botany*, 68(20), 5485–5495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx355>
- Reimann, R., Kost, B., y Dettmer, J. (2017). Tetraspanins in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00545>

- Rey, T., y Jacquet, C. (2018). Symbiosis genes for immunity and vice versa. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.010>
- Robertson, J. G., Lyttleton, P., Bullivant, S., y Grayston, G. F. (1978). Membranes in lupin root nodules. I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *Journal of Cell Science*, 30, 129–149. <https://doi.org/10.1242/jcs.30.1.129>
- Roth, R., Hillmer, S., Funaya, C., Chiapello, M., Schumacher, K., Presti, L. Lo, ... Paszkowski, U. (2019). Arbuscular cell invasion coincides with extracellular vesicles and membrane tubules. *Nature Plants*, 5, 204–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41477-019-0365-4>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., ... 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>
- Roy, S., Liu, W., Sekhar, R., Crook, A., Mysore, K., Pislariu, C., ... Udvardi, M. K. (2019). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Ruivo, C. F., Adem, B., Silva, M., y Melo, S. A. (2017). The biology of cancer exosomes: insights and new perspectives. *Cancer Research*, 77(23), 6480–6488. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0994>
- Rutter, B. D., y Innes, R. W. (2017). Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant Physiology*, 173(1), 728–741. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01253>
- Rutter, B. D., y Innes, R. W. (2018). Extracellular vesicles as key mediators of plant – microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.008>
- Rybak, K., y Robatzek, S. (2019). Functions of Extracellular Vesicles in Immunity and Virulence. *Plant Physiology*, 179(April), 1236–1247. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01557>
- Schmittgen, T. D., y Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schüßler, A., Schwarzott, D., y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413–1421. <https://doi.org/10.1017/S0953756201005196>
- Shapiro, S. S., y Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591–611. <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Shinya, T., Nakagawa, T., Kaku, H., y Shibuya, N. (2015). Chitin-mediated plant-fungal interactions: Catching, hiding and handshaking. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.032>
- Siegmund, U., Heller, J., van Kan, J. A. L., y Tudzynski, P. (2013). The NADPH Oxidase Complexes in *Botrytis cinerea*: Evidence for a Close Association with the ER and the Tetraspanin Pls1. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055879>
- Sprent, J. I. (2008). 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1081–1084. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm286>
- Stougaard, J., Jørgensen, J.-E., Christensen, T., Kühle, A., y Marcker, K. (1990). Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and *N23* gene promoters. *Molecular y General Genetics*, 220(3), 353–360. <https://doi.org/10.1007/BF00391738>
- Suzaki, T., Yoro, E., y Kawaguchi, M. (2015). Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. En *International Review of Cell and Molecular*

- Biology* (Vol. 316). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.004>
- Termini, C. M., y Gillette, J. M. (2017). Tetraspanins function as regulators of cellular signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00034>
- Trouvelot, A., Kough, J., y Gianinazza-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Paris.
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, 5(2), 99. <https://doi.org/10.2307/3001913>
- Valdés-López, O., Arenas-Huertero, C., Ramírez, M., Girard, L., Sánchez, F., Vance, C. P., ... Hernández, G. (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant, Cell and Environment*, 31(12), 1834–1843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01883.x>
- Vieweg, M. F., Frühling, M., Quandt, H. J., Heim, U., Bäumlein, H., Fühler, A., ... Perlick, A. M. (2004). The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(1), 62–69. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.62>
- Wang, Fei, Shang, Y., Fan, B., Yu, J. Q., y Chen, Z. (2014). Arabidopsis LIP5, a Positive Regulator of Multivesicular Body Biogenesis, Is a Critical Target of Pathogen-Responsive MAPK Cascade in Plant Basal Defense. *PLoS Pathogens*, 10(7), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004243>
- Wang, Feng, Muto, A., Velde, J. Van De, Neyt, P., Himanen, K., Vandepoele, K., y Van Lijsebettens, M. (2015). Functional Analysis of the Arabidopsis TETRASPANIN Gene Family in Plant Growth and Development. *Plant Physiology*, 169, 2200–2214. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01310>
- Wang, Feng, Vandepoele, K., y Lijsebettens, M. Van. (2012). Tetraspanin genes in plants. *Plant Science*, 190, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.03.005>
- Webber, J., Steadman, R., Mason, M. D., Tabi, Z., y Clayton, A. (2010). Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Research*, 70(23), 9621–9631. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1722>
- Zhang, X., Pumplin, N., Ivanov, S., y Harrison, M. J. (2015). EXO70I is required for development of a sub-domain of the periarbuscular membrane during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Biology*, 25, 2189–2195. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.075>
- Zhang, Z. L., Xie, Z., Zou, X., Casaretto, J., Ho, T. H., y Shen, Q. (2004). A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology*, 134(4), 1500–1513. <https://doi.org/10.1104/pp.103.034967>
- Zhou, X., Xiang, Y., Li, C., y Yu, G. (2020). Modulatory role of reactive oxygen species in root development in model plant of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.485932>
- Zimmerman, B., Kelly, B., McMillan, B. J., Seegar, T. C. M., Dror, R. O., Kruse, A. C., y Blacklow, S. C. (2016). Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*, 167(4), 1041–1051.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.056>