

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Biotecnología

Departamento de Biología Molecular de Plantas

Eventos tempranos de una línea mutante de frijol incapaz de nodular (NN-DOR364) durante la interacción simbiótica con Rhizobium etli

Que para obtener el título de Maestría en Ciencias Bioquímicas

Presenta:

Emilia Alemán Mata

bajo la asesoría del
Dr. Luis Cárdenas Torres

Enero/2006.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Emilia Alemán Mata

FECHA: 23/01/06

FIRMA: [Firma]

01 735 3577250



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

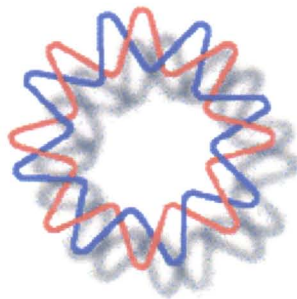


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Esta tesis fue realizada en el **Instituto de Biotecnología/UNAM** en el Departamento de Biología Molecular de Plantas en el laboratorio a cargo de los Drs. Carmen Quinto y Federico Sánchez, bajo la asesoría del Dr. Luis Cárdenas Torres y bajo apoyo becario de **CONACyT** con número de registro **176451**.

Esta tesis se la dedico a las personas más importantes en mi vida como lo son Dios, mis padres Mario y Angela, mi querido esposo Eduardo y mi adorada hija Susy.

INDICE

RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN	2
Fijación Biológica de Nitrógeno	2
Eventos tempranos en la interacción rizobio-leguminosa	2
Proceso de Interacción rizobio-leguminosa	3
Percepción de los Factores de Nodulación por la Planta	5
Pelos Radicales	7
Formación del Hilo de Infección	11
Genes expresados durante la Organogénesis del Nódulo	13
<i>Nodulinas tempranas</i>	14
<i>Proteínas ricas en Prolina</i>	15
<i>Posibles papeles de las ERO durante la simbiosis</i>	17
<i>Nodulinas tardías</i>	18
Simbiosis Planta-Micorriza Arbuscular (MA)	19
Infección por Micorrizas Arbusculares	19
<i>Eventos comunes en los procesos de nodulación</i>	22
<i>Mutantes micorrízicas</i>	23
II. ANTECEDENTES	26
Caracterización de mutantes de leguminosas durante la simbiosis	26
Hipótesis	28
Objetivo General	28
Objetivos Particulares	28
III. METODOLOGÍA	29
Variedad de Frijol DOR364	29
Germinación de semillas	30
Análisis genético de la línea mutante NN-DOR364	30
Montaje de plántulas de frijol para la determinación del Calcio intracelular	31
Microinyección de pelos radicales	31
Incubación de los pelos radicales con FNs	31
Adquisición y Procesamiento de Imágenes	32
Inoculación de plantas de frijol con <i>Rhizobium etli</i>	32
Expresión de Nodulinas en respuesta a <i>R. etli</i> y <i>G. intraradices</i>	32
Extracción y transferencia de RNA	33
Preparación de Sondas	34
Experimentos tipo <i>Northern</i>	35
Infección por Micorrizas (<i>Glomus intraradices</i>)	35
Tinción de raíces colonizadas por <i>G. intraradices</i>	36
IV. RESULTADOS	38
Análisis genético de la línea mutante NN-DOR364	38
Actividad biológica de los FNs en los pelos radicales de las plantas tipo silvestre y mutante NN-DOR364	39
Expresión de nodulinas en respuesta a la infección por <i>R. etli</i>	41
<i>Expresión de ENOD40, una nodulina temprana</i>	41
<i>Expresión de ENOD2</i>	43
<i>Expresión de Leghemoglobina (LB)</i>	45

Determinación de los niveles de Calcio intracelular en la línea mutante NN-DOR364	46
Oscilaciones de calcio en la mutante NN-DOR364 en respuesta a los FNs	47
Infección por micorrizas	50
Expresión de LB en respuesta a la inoculación con <i>G. intraradices</i>	52
V. DISCUSIÓN	55
VI. CONCLUSIONES	57
Perspectivas	58
VII. BIBLIOGRAFÍA	59

RESUMEN

Las plantas de la familia *Leguminosae* mantienen una asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno de la familia *Rhizobiaceae*, la cual permite la asimilación del nitrógeno atmosférico por las plantas, un elemento indispensable para la síntesis de compuestos esenciales en su desarrollo. La bacteria sintetiza una molécula señalizadora en respuesta a la estimulación de la planta mediante compuestos fenólicos llamados flavonoides. Esta molécula señalizadora denominada Factor de Nodulación (FNs), es percibida por la planta por receptores específicos e inducen una serie de respuestas en los pelos radicales en cuestión de segundos como los cambios en la concentración de calcio intracelular y extracelular en el ápice del pelo, despolarización de la membrana, y cambios de pH citosólico. Posteriormente inducen aumento y disminución periódica de los niveles de calcio en la región perinuclear conocido como oscilaciones de calcio y la deformación de los pelos radicales. Además los FNs inducen respuestas más tardías como la activación de la expresión de genes de nodulación llamados nodulinas, que son necesarias para la organogénesis y función del nódulo, un nuevo órgano en la planta donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno por los rizobios.

En este trabajo se presenta la caracterización de una mutante de frijol incapaz de nodular (NN-DOR364) que se obtuvo a partir de la cruce de la línea mutante NOD125 con el fondo genético DOR364. La mutante NOD125 se originó a partir del genotipo RIZ30 con el agente mutágeno EMS. La caracterización genética de la mutante NN-DOR364 muestra herencia monogénica recesiva.

Cuando la mutante NN-DOR364 es tratada con los FNs, los pelos radicales responden con un aumento de calcio intracelular y posteriormente se observan las oscilaciones de calcio. Los pelos radicales responden con hinchazón y ramificación pero no con enroscamiento. El patrón de expresión de las nodulinas tempranas como ENOD40 y ENOD2 y la nodulina tardía Leghemoglobina difiere en la mutante con respecto a la planta tipo silvestre en respuesta a la inoculación con *R. etli*. Sin embargo aun mantiene la capacidad de ser infectada con *Glomus intraradices* una asociación que comparte eventos en la cascada de señalización bacteriana. La leghemoglobina una nodulina que también se expresa en respuesta a la inoculación con micorrizas no se induce en esta mutante. Estos resultados nos sugieren que la mutación afectó la cascada de señalización río abajo de la percepción de los FNs y los eventos comunes entre la asociación micorrízica y bacteriana.

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

Fijación Biológica de Nitrógeno

Eventos tempranos en la interacción rizobio-leguminosa

Proceso de Interacción rizobio-leguminosa

Estructura de los Factores de Nodulación por la planta

Pelos Radicales

Formación del Hilo de Infección

Genes expresados durante la Organogénesis del Nódulo

Nodulinas tempranas

Proteínas ricas en prolina

Posibles papeles de las ERO durante la simbiosis

Nodulinas tardías

Simbiosis Planta-Micorriza Arbuscular (MA)

Infección por Micorrizas Arbusculares

Eventos comunes en los procesos de nodulación y micorrización

Mutantes micorrízicas

INTRODUCCIÓN

Fijación Biológica de Nitrógeno

El nitrógeno es un elemento indispensable para el desarrollo de las plantas, ya que forma parte de moléculas esenciales, como los aminoácidos, los ácidos nucleicos y las vitaminas, entre otros. A pesar de que la atmósfera tiene un alto contenido de nitrógeno ($N_2=78\%$), éste, no puede ser asimilado por las plantas debido a que debe estar en forma reducida como el ión amonio (NH_4^+). Sin embargo, las plantas de la familia *Leguminosae* establecen una relación simbiótica con bacterias Gram-negativas del suelo de la familia *Rhizobiaceae* que le permiten assimilar este nitrógeno. Estas bacterias pertenecen a los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, y fijan el 90% del Nitrógeno atmosférico, el cual es aprovechado directamente por las leguminosas, e indirectamente por otras plantas. Este proceso se lleva a cabo gracias al intercambio de señales específicas entre la planta y el microorganismo simbiote que da como resultado la formación de un nuevo órgano en la planta: el nódulo radical, en el cual las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico a una forma asimilable por las plantas como lo es el NH_4^+ . A cambio los rizobios obtienen de la planta ácidos dicarboxílicos como su fuente de carbono (Hirsch, 1992).

Eventos tempranos en la interacción rizobio-leguminosa

La interacción simbiótica inicia cuando la planta libera una señal de naturaleza flavonoide al medio que la rodea (Fig. 1a). Estos flavonoides son percibidos de manera específica por la bacteria mediante la proteína NodD, la cual se encuentra en su membrana que al reconocer los flavonoides de manera específica, forma un complejo Flavonoide-NodD (Hirsch et al., 2001) (Fig. 1b). Posteriormente este complejo activa la transcripción de los genes de nodulación conocidos como genes *nod* cuyos productos son responsables de sintetizar y liberar señales al medio, denominados Factores de Nodulación (FNs). Estos factores son moléculas clave para el establecimiento del diálogo molecular entre la bacteria y la planta (Fig. 1c) (Schultze et al., 1994).

Los pelos radicales de la planta responden a los FNs induciendo eventos tan rápidos como variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular y extracelular (Cárdenas et al., 1999a; Felle et al., 1998), cambios de pH en el citosol (Felle et al., 1996), despolarización de la membrana plasmática (Ehrhardt et al., 1992), fragmentación de los filamentos de actina (Cárdenas et al., 1998), oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (Cárdenas et al., 1999a; Ehrhardt et al., 1996), hinchazón, deformación y enroscamiento de los pelos radicales (Fig.1d) (Heidstra et al.,

1994). En la Tabla 1 se muestran en orden cronológico algunos de los eventos tempranos mejor descritos en la literatura en plantas leguminosas en respuesta a los NFs.

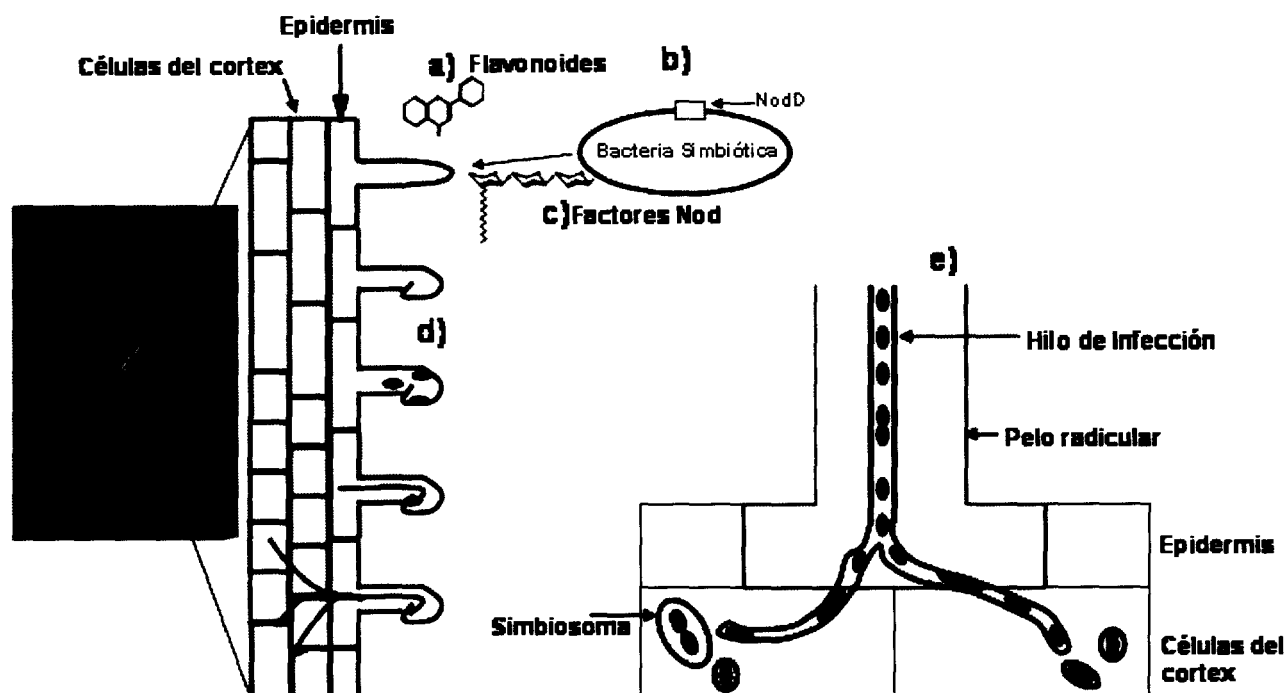


Figura 1. Etapas tempranas del proceso de interacción planta-rizobios. a) La planta libera flavonoides al medio que son reconocidos por la proteína NodD de la bacteria, b) La proteína NodD y el flavonoide secretado por la planta forman un complejo que activa la transcripción de los genes *nod* resultando en la síntesis y secreción de los FNs. c) los FNs inducen diferentes respuestas en la planta desde cambios en la concentración de Ca^{2+} , rearrreglos del citoesqueleto, deformación de los pelos radicales y activación de la división en las células del cortex (d) entre otros. En e) se muestra el conducto por el cual las bacterias se introducen hasta las células en división (hilo de infección) liberándolas en pequeñas vesículas de membrana vegetal llamada membrana peribacteroidal.

Proceso de Interacción rizobio-leguminosa

La bacteria es inicialmente quimioatraída por los flavonoides que secreta la planta y se une al pelo radical en crecimiento que a su vez, es activado por los FNs. Los pelos radicales se enroscan atrapando a las bacterias en una estructura que asemeja una bolsa. Las bacterias dentro de la bolsa estimulan la formación de un hilo de infección por donde se da la entrada de las bacterias a las raíces de la planta. Este hilo de infección es una estructura tubular formada por invaginación de la pared celular del pelo radical (ver Fig. 1e).

El hilo de infección crece hacia el interior modificando en cierta forma la polaridad inicial del pelo radical en crecimiento. Durante este proceso, el núcleo de la célula que forma el pelo, migra hacia su base seguido por el hilo de infección en desarrollo. El movimiento del núcleo se correlaciona con la capacidad de guiar al hilo de infección en crecimiento hacia las células del cortex en donde se ramifica hacia diferentes células adyacentes del cortex que

simultáneamente entre en división. El hilo de infección que ha llegado a las células corticales, libera a las bacterias por un proceso de exocitosis y a su vez, estas bacterias son endocitadas por las células en división del cortex quedando rodeadas por una membrana de origen vegetal (membrana peribacteroidal). Las bacterias posteriormente se diferencian en bacteroides, los cuales aumentan de tamaño y cambian de forma. El volumen de estos bacteroides puede ser 10 veces más grande que el de la bacteria original y están separados del citoplasma de las células por la membrana peribacteroidal. A este conjunto se le conoce como simbiosoma (Fig. 1e) (Heldt, 1996; Kosuge and Nester, 1989; Raven et al., 1992). Finalmente, es en el nódulo y bajo esta forma de bacteroide, que los rizobios pueden iniciar la fijación de nitrógeno.

Tabla1. Eventos tempranos inducidos por el tratamiento con FNs.

Eventos que ocurren en pelos radicales y/o raíces de leguminosas	Tiempo transcurrido después del tratamiento con los FNs ó inoculación con <i>Rhizobium</i> .	Referencia
Cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular y extracelular.	Antes de los 15 segundos hasta 5 min.	(Cárdenas et al., 1999a; Felle et al., 1998)
Cambios de pH citosólico	15 segundos	(Felle et al., 1996)
Despolarización de la membrana	30 segundos	(Ehrhardt et al., 1992)
Fragmentación de los microfilamentos de actina	5 minutos	(Cárdenas et al., 1998)
Oscilaciones de Ca^{2+}	10-15 minutos	(Cárdenas et al., 1999a; Ehrhardt et al., 1996)
Hinchazón y ramificación de pelos radicales	1-2 horas	(Heidstra et al., 1994)
Acumulación de especies reactivas de oxígeno	3 horas	(Ramu et al., 2002)
Enroscamiento de los pelos radicales	4 horas	(Heidstra et al., 1994)
Expresión de Nodulinas		
Expresión de CHS	1-2 horas	(Ryder et al., 1987)
Expresión de <i>ENOD12</i>	A partir de las 2 horas a 7 días en adelante	(Allison et al., 1993; Pingret et al., 1998)
Expresión de <i>Rip1</i>	A partir de las 3 horas	(Cook et al., 1995)
Expresión de <i>ENOD11</i>	A partir de las 3 horas	(Journet et al., 2001)
División celular	20-24 horas	(Yang et al., 1994)
Expresión de Leghemoglobina	A partir de 18 horas	(Stracke et al., 2002)
Expresión de <i>ENOD40</i>	A partir de 24 horas	(Flemetakis et al., 2000)
Formación hilos de Preinfección	24 horas	(Yang et al., 1994)
Expresión de <i>ENOD2</i>	A partir de los 7 días	(van de Wiel et al., 1990)

Percepción de los Factores de Nodulación por la Planta

Los FNs son moléculas anfífilas formadas por un esqueleto de 3 a 6 unidades de β -1,4 *N*-acetil-glucosamina (GlcNac), un ácido graso insaturado unido al nitrógeno del extremo no reductor y diferentes modificaciones químicas a lo largo de toda la molécula tanto en el extremo reductor, como en el extremo no reductor. Cada especie de rizobios sintetiza esta molécula con diferentes decoraciones (metilación, carbamoilación, acetilación, sulfatación, fucosilación, etc.), diferente longitud del oligómero (tetrámero, pentámero, etc.) y con variaciones en la longitud e insaturaciones de la cadena del ácido graso, siendo éstas diferencias, determinantes de especificidad en la planta hospedera (Fig. 2) (Hirsch et al., 2001).

A los genes bacterianos que juegan un papel importante en el proceso de nodulación, se les ha llamado genes *nod*, *nol* y *noe*. La síntesis del esqueleto de los FNs está codificada por los genes que se conocen como *nod* comunes y son: *nodA*, *B* y *C*; el papel de *nodC* consiste en unir a los monómeros de *N*-acetil-glucosamina, el de *nodB*, en remover el grupo acetilo del extremo no reductor y el papel de *nodA* es el de transferir la cadena de ácido graso al grupo amino libre resultante de la desacetilación. Los genes *nod* llamados “específicos”, codifican para enzimas que modifican químicamente la molécula “señal”, adicionando diversos sustituyentes químicos que le dan especificidad en su reconocimiento por la planta hospedera (Hirsch et al., 2001). En la Figura 2 se muestra la estructura general de los FNs secretados por los rizobios y las diversas modificaciones químicas descritas a la fecha.

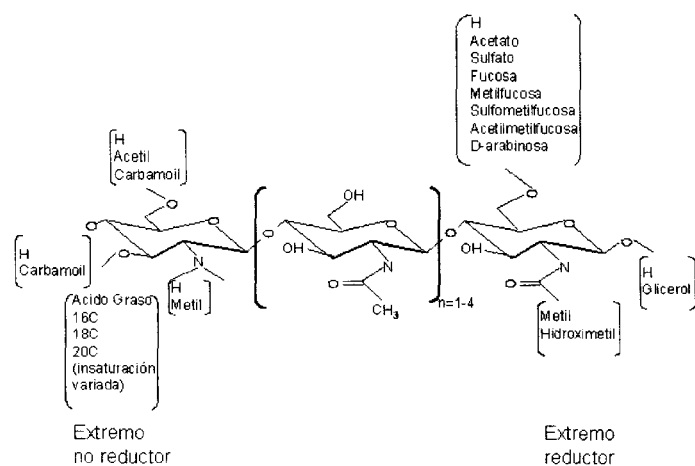


Figura 2. Estructura general de los FNs. Los FNs están compuestos por oligómeros de *N*-acetil-glucosamina y un ácido graso. También se muestran las diferentes modificaciones químicas de estos FNs en sus extremos reductor y no reductor, dependiendo de la especie de rizobio. Tomado de Hirsch et al., 2001.

Mediante la purificación de los FNs provenientes de diferentes especies de rizobios, se logró describir su estructura y función en la planta: los FNs, a concentraciones nanomolares,

inducen cambios rápidos, en el orden de segundos después de su aplicación a los pelos radicales (ver tabla 1).

El hecho de que los FNs se requieran a concentraciones muy bajas, sugiere que su percepción está mediada por receptores específicos, probablemente situados en la membrana de los pelos radicales (Ardourel et al., 1994). Se han descrito mutaciones que afectan tanto la capacidad de nodular como la de formar micorizas, lo que apoya la idea de una vía común para la señalización (Oldroyd and Downie, 2004). Recientemente se identificaron dos genes que codifican para receptores tipo cinasa que están involucrados en la percepción de los FNs en *Lotus japonicus* (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003); a estos receptores se les han denominado NFR1 y NFR5 (Nod Factor Receptor). Estos receptores contienen en su región extracelular dominios LysM, los cuales son típicos de proteínas con capacidad de unión a peptidoglicanos y a quitinas, lo cual sugiere que pueden estar directamente involucrados en la percepción exclusiva de los FNs, ya que estos receptores son indispensables para disparar las primeras respuestas celulares y fisiológicas inducidas por los FNs como son la deformación, la despolarización de la membrana y los cambios de pH extracelular de los pelos radicales (ver Fig. 3) (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003). Además, mutaciones en NFR1 y NFR5 resultan en un fenotipo de no nodulación (Nod^-) y mantienen la capacidad de ser colonizadas por micorizas (Radutoiu et al., 2003).

La clonación de el gen NORK (Nodulation Receptor Kinase) de *Medicago truncatula* y su ortólogo SYMRK (Symbiosis Receptor-like Kinase) de *L. japonicus*, que codifican para proteínas que se clasifican como receptores tipo cinasa con dominios ricos en leucina (LRR) (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002), permitió descubrir que estos genes son esenciales para la señalización tanto en el proceso de nodulación como en el de micorrización (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Mutaciones en estos genes inhiben la nodulación y la formación de micorizas (Stracke et al., 2002) lo que sugiere una vía de señalización compartida entre estos dos procesos

En la Figura 3 se muestra un modelo simplificado del mecanismo de percepción de los FNs en los pelos radicales de las leguminosas. Hipotéticamente los receptores NFR1 y NFR5 se encuentran formando un complejo que reconoce específicamente a los FNs, estos serían responsables de la transducción de señales que desencadenan en flujos iónicos, despolarización de la membrana e hinchamiento de los pelos radicales; el receptor SYMRK/NORK de alguna forma estaría funcionando en el reconocimiento de elicitores bacterianos y micorrízicos. Aun no se sabe exactamente cómo se inducen las oscilaciones de Ca^{2+} , pero en *L. japonicus* se han caracterizado dos genes llamados *CASTOR* y *POLLUX*, los cuales son los ortólogos correspondientes de *dm1*. El gen *dm1* codifica para una proteína con similitud a canales catiónicos que se localizan en los plástidos (Ane et al., 2004; Imaizumi-

Anraku et al., 2005), y se propone que tienen un papel en la generación de las oscilaciones en calcio. En *M. truncatula* se ha clonado recientemente el gen *dmi3* que codifica para una cinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina (CCaMK) (Mitra et al., 2004), lo cual adquiere un especial interés ya que se sabe que este tipo de cinasas pueden reconocer patrones de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular, y más aun porque recientemente se demostró que la proteína DMI3 se encuentra localizada en el núcleo (Smit et al., 2005). Es interesante que NSP1 y NSP2 son miembros de la familia GRAS de activadores transcripcionales y que mutaciones en estos genes resultan en un fenotipo de no nodulación, sin embargo, retienen la capacidad de micorrizar (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005). Dado que estos activadores transcripcionales se encuentran en el núcleo, es muy probable que sean los blancos que DMI3 pudiera fosforilar e inducir su activación, los cuales a su vez podrían inducir la transcripción de los genes inducidos por los FNs (nodulinas), que finalmente son los responsables de la formación del hilo de infección y de la organogénesis del nódulo (Endre et al., 2002; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Stracke et al., 2002).

Existen muchas otras mutantes de leguminosas en este proceso que están menos caracterizadas. El análisis de más mutantes es una herramienta que permitirá disectar la vía de señalización en respuesta a los FNs.

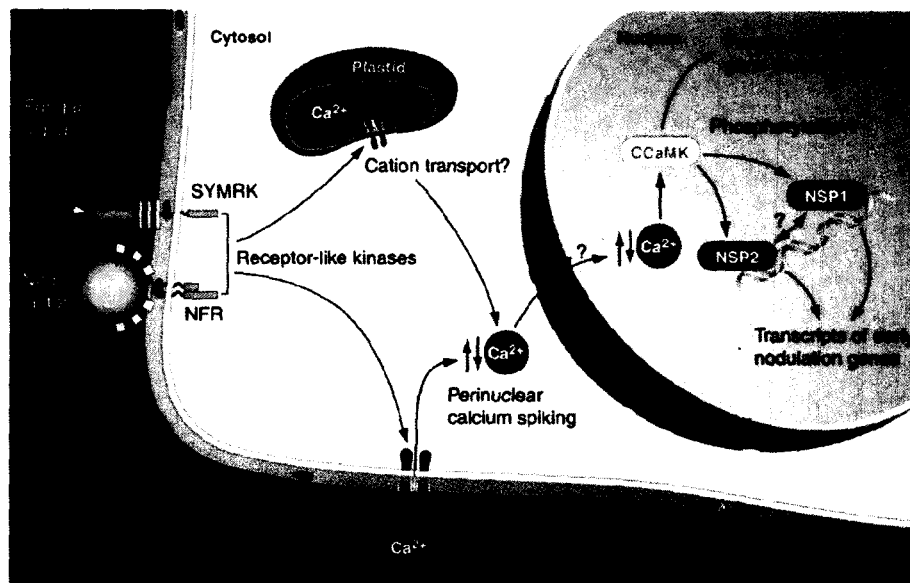


Figura 3. Modelo propuesto para la percepción de los FNs mediante el complejo receptor NFR1, NFR5 y SYMRK. También se incluyen otras proteínas indispensables en la señalización como el canal catiónico localizado en los plástidos (DMI1) y la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina (CCaMK) (DMI3), así como los recientemente caracterizados NSP1 y NSP2, descritos como probables activadores transcripcionales. Udvardi et al., 2005

Pelos Radicales

Los pelos radicales son muy importantes para la planta porque aumentan la capacidad de absorción de la raíz al aumentar su área de superficie (Fig. 4A). Son células tubulares que se

derivan de las células de la epidermis de la raíz, conocidas como tricoblastos y no se dividen. Los pelos radicales crecen por la adición de precursores de la pared celular al ápice en crecimiento mediante vesículas de exocitosis reguladas por altas concentraciones de Ca^{2+} en la zona apical del pelo (Wymer et al., 1997).

Se conocen tres zonas principales en la raíz dependiendo del estado de desarrollo de los pelos radicales que son: la zona emergente, la zona de crecimiento, y la zona de maduración de los pelos radicales (Fig. 4B), mientras que el pelo radical se divide en tres partes: la parte del ápice del pelo, la zona de vacuolación y la zona del pie o basal (Fig. 4D).

El crecimiento del pelo radical en general comprende cuatro fases de crecimiento (mostradas en la Figura 4C): 1) Los pelos radicales emergen en forma cónica de las células epidérmicas superficiales y cuatro horas después, el flujo citoplásmico es rápido y el núcleo migra a la base del crecimiento del pelo. 2) En seis horas, el pelo es bastante largo y permite al núcleo moverse de un lugar a otro. El flujo citoplásmico rápido se encuentra en la punta del pelo. 3) De seis a ocho horas de crecimiento, el flujo citoplásmico se reduce un poco. 4) En diez horas el crecimiento normal se detiene y el flujo citoplásmico se reduce, además, la vacuola llega a ocupar el 90% del área del pelo (Gage., 2004).

En *M. truncatula* el proceso de desarrollo de los pelos radicales inicia con el núcleo de una célula epidérmica moviéndose al centro donde una protuberancia del pelo radical se desarrolla (Sieberer and Emons, 2000). El etileno puede estar involucrado como un regulador de la diferenciación del tricoblasto a pelo radical en la epidermis, esto se observa inicialmente como una protuberancia llena de citoplasma y crece fuera de la superficie de la raíz de manera apical (primera fase de crecimiento del pelo radical). El pelo radical en extensión contiene una masa de citoplasma en su punta, una vacuola grande en la parte media del pelo (zona de vacuolación o elongación del pelo radical) y una pequeña envoltura de citoplasma entre la membrana vacuolar y la membrana plasmática del pelo radical. Conforme avanza el crecimiento, el núcleo de la célula epidérmica deja su posición de la pared periclinal interna, entra al pelo radical y se posiciona en la región densa citoplásmica aproximadamente 30 μm abajo de la punta (estos pelos pertenecen a la zona I de la raíz), el núcleo permanece a esta distancia de la punta, así como la punta crece rápidamente alejándose de la superficie de la raíz (segunda fase de crecimiento del pelo radical). En la medida que el pelo radical se aproxima a su madurez, el crecimiento se vuelve más lento y la vacuola entra en la región densa citoplásmica debajo del ápice del pelo y el núcleo cesa de seguir al ápice (zona II de la raíz y tercera fase de crecimiento del pelo radical). En los pelos que han terminado de crecer, la vacuola se extiende cerca de la punta del pelo y el núcleo puede ser encontrado en cualquier lugar de la célula (esos son pelos radicales de la zona III de la raíz y cuarta fase de crecimiento del pelo radical) (Sieberer and Emons, 2000) (Fig. 4B, C y D).

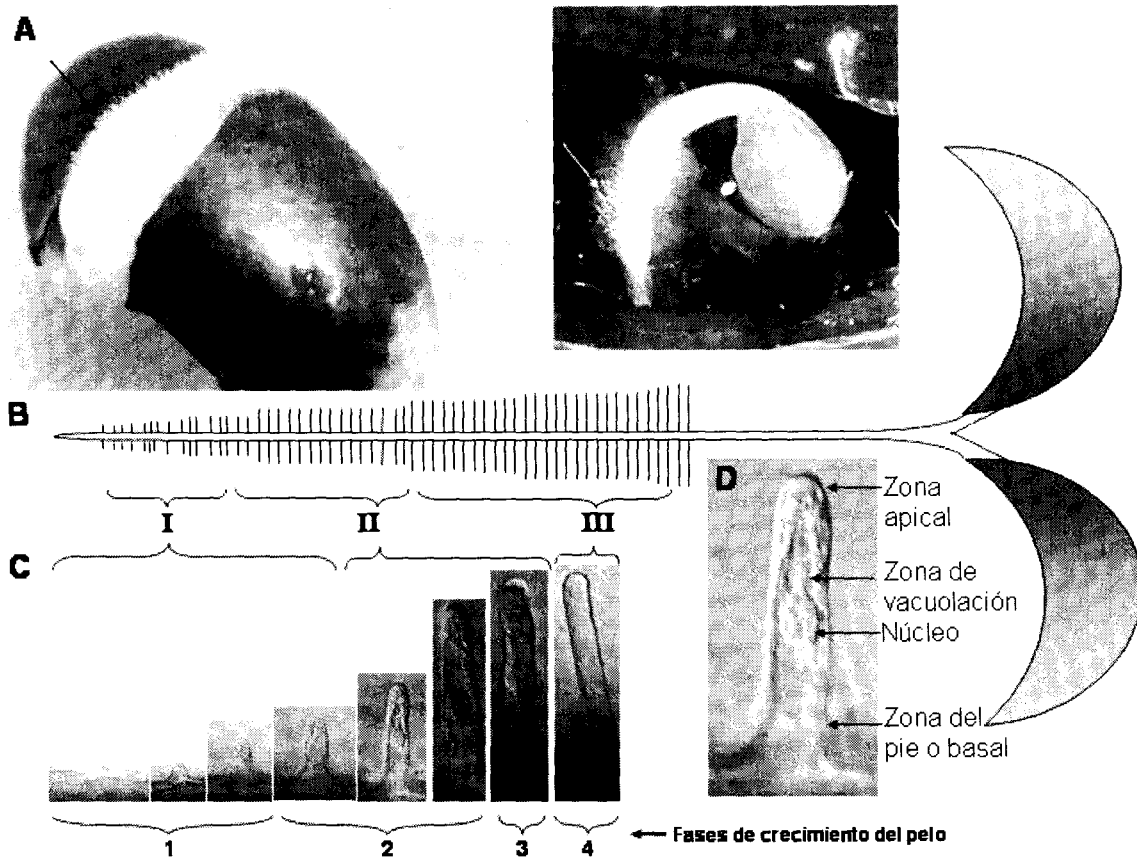


Figura 4. Desarrollo de los pelos radicales. A, Semillas germinadas de frijol y lotus respectivamente mostrando la emergencia de los pelos radicales señalados por las flechas. B, Muestra las diferentes zonas de la raíz en función del desarrollo de los pelos radicales. La zona I es la zona de emergencia de los pelos radicales, la zona II, comprende a los pelos radicales en crecimiento rápido. A la zona III pertenecen los pelos radicales maduros que han dejado de crecer. C, Diferentes fases de crecimiento de los pelos radicales. D, Muestra las zonas de un pelo radical en desarrollo. La zona apical, de vacuolación o elongación y la del pie o basal.

Los pelos radicales, al igual que los tubos polínicos se elongan a través de la secreción polarizada de vesículas a la región de la punta, acompañado de un ablandamiento de la pared de la punta bajo la influencia de presión de turgor interno o pH. Así, el gradiente espacial en las propiedades del material del ápice en crecimiento, tienen un papel importante en sus características de crecimiento y en las formas del pelo radical (Hepler et al., 2001).

Las vesículas que se fusionan en la punta de los pelos radicales son derivadas del aparato de Golgi que se encuentra a una distancia corta debajo de la punta en crecimiento. Las vesículas liberan componentes de membrana y de pared celular que son incorporados en la membrana plasmática, en la pared celular y en la matriz extracelular. Durante el crecimiento del ápice, el flujo citoplásmico depende de los microfilamentos de actina que llevan vesículas y otros organelos a la región apical de la célula. La región inmediatamente adyacente a la punta,

no exhibe un flujo citoplásmico activo y está libre de organelos. Esta región denominada la “zona clara” contiene las vesículas que se fusionan con la punta y liberan el material requerido para el crecimiento (Hepler et al., 2001). Debido a que las vesículas se liberan en la base de la zona clara y son consumidas en el ápice, esto ha sugerido, que la sola difusión puede ser suficiente para transportar las vesículas en la base de la zona clara a su sitio de fusión cerca de la punta del pelo radical (Miller et al., 1999).

Existen evidencias fuertes que sugieren que el movimiento de organelos y vesículas en el flujo citoplásmico involucra motores basados en miosina moviéndose a lo largo de los filamentos de actina y aunque se ha detectado que los microtúbulos también participan en el proceso de crecimiento, en el mantenimiento de la estructura normal de la región densa citoplásmica subapical y en la posición del núcleo, su papel en la punta del pelo en crecimiento, es menos claro que el de los microfilamentos de actina (Lloyd et al., 1987). Así mismo se ha atribuido al calcio un papel importante en el crecimiento apical (Hepler et al., 2001). En pelos en crecimiento, la concentración de sus iones en el ápice, justo debajo de la membrana plasmática es cerca de 2 μM y decae a una concentración basal de cerca de 100 nM dentro de una distancia de 20 μm . La manipulación de los gradientes de Ca^{2+} y las observaciones hechas durante el reestablecimiento de estos gradientes, indican que la dirección del crecimiento de la punta se lleva a cabo en las regiones con más alta concentración de iones Ca^{2+} , tanto en los tubos polínicos como en los pelos radicales (Bibikova et al., 1999).

La mutante de *Arabidopsis* (*rhd2*) (Foreman et al., 2003) que se caracteriza por desarrollar pelos cortos, está afectada en la NADPH oxidasa. Esta enzima tiene la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual sugiere que la generación de ERO se requiere para la elongación normal de los pelos radicales en *Arabidopsis*. Las mutantes *rhd2* muestran además deficiencia en el gradiente de Ca^{2+} apical debido a una actividad alterada en los canales de Ca^{2+} (Foreman et al., 2003). Se ha propuesto, que la NADPH oxidasa puede generar ERO que activan los canales de Ca^{2+} que están asociados al proceso de elongación del pelo radical, para mantener los gradientes de este ión en la punta del pelo (Foreman et al., 2003).

En plantas, las GTPasas pequeñas llamadas ROPs y Rho están involucradas en una variedad de funciones incluyendo transducción de señales, control de la dinámica de actina y control del crecimiento polar del pelo radical y tubos polínicos (Gage, 2004; Jones et al., 2002).

Los pelos radicales de las plantas leguminosas se deforman en presencia de los FNs purificados de especies rizobiales específicos. Los pelos más susceptibles a la deformación son los que se encuentran en la zona II de la raíz, que corresponden a los que están creciendo activamente. La deformación inducida por los FNs inicia con un hinchamiento isodiamétrico de

la punta del pelo radical y es seguido por el establecimiento de un nuevo ápice en crecimiento (Sieberer and Emons, 2000).

Existen muchos otros componentes involucrados en el crecimiento y desarrollo de los pelos radicales, como son: las hormonas cinetina, ácido abscísico, brasinosteroides y la hormona sintética 2,4-D que estimulan la elongación del pelo radical; la cinetina y el ácido abscísico causan ramificación y otros cambios morfológicos tales como hinchazón de la punta o la base y enroscamiento similares al efecto de *Rhizobia* en leguminosas. La respuesta de los pelos radicales para deformarse en presencia de los FNs se modula por hormonas vegetales tales como etileno que tiene influencia en el grado de deformación de los pelos radicales y la frecuencia de infecciones exitosas (Oldroyd et al., 2001a). Tales cambios en los niveles de etileno o en otros sistemas de señalización por hormonas durante el crecimiento de la raíz puede explicar la variabilidad observada en las respuestas de los pelos a los FNs (Gage, 2004).

Puesto que los pelos radicales tienen un papel muy importante en la planta, como receptores de muchas señales y moléculas necesarias no sólo para la raíz sino para el organismo completo, su estudio es fundamental, tanto para entender su fisiología individual como su respuesta ante diversos factores ambientales, siendo uno de ellos los FNs.

Formación del Hilo de Infección

Los hilos de infección, son tubos formados de material proveniente de la pared de las células de los pelos radicales, de las células corticales de la raíz y los meristemos de nódulos; los hilos de infección, únicamente se inducen en la presencia de la bacteria. Estos, usualmente inician en pelos radicales enroscados, en las uniones de los pelos ramificados o donde dos pelos radicales se encuentran presionados uno con el otro. En algunas leguminosas como alfalfa y lotus, el hilo de infección es guiado por los hilos de preinfección, estos son puentes citoplásmicos formados en las células corticales de la raíz y son reminiscencias de fragmosomas, las primeras estructuras formadas cuando las células inician la división celular (van Brussel et al., 1992). La degradación de la pared del pelo radical en el sitio de la iniciación del hilo de infección y la subsiguiente aproximación de la bacteria hacia la membrana se observa en diferentes leguminosas (Gage, 2004). La pregunta de cuál de los dos simbioses (si la bacteria o planta) es responsable de la degradación de la pared, permanece abierta. Los rizobios tienen enzimas que son capaces de degradar celulosa y otros polisacáridos de pared celular de la planta (Zorreguieta et al., 2000). Sin embargo, existen diversos reportes que muestran que tanto la planta como la bacteria contribuyen a la formación del hilo de infección.

Con respecto a la participación de las bacterias (rizobios) en la formación del hilo de infección, se ha propuesto que los genes *nod F* y *L* de *Sinorhizobium meliloti* cuyos productos

causan modificaciones en el extremo no reductor de los FNs, juegan un papel importante ya que en *M. truncatula* inoculadas con mutantes en los genes *nod F* y *L* de *S. meliloti*, (FNs que carecen de acetato y el ácido graso C16:2 cambia a C18:1), no inducen la formación del hilo de infección (Ardourel et al., 1994). Estos resultados sugieren que las modificaciones de los FNs en el extremo no reductor es esencial para la formación del hilo de infección (ver figura 2).

Así mismo, se ha demostrado que ciertos genes de las plantas leguminosas también están involucrados en el proceso de formación del hilo de infección. Se han identificado a los genes *LYK3* y *LYK4* en *M. truncatula* como fuertes candidatos para ser los receptores de los FNs y que también se requieren para la iniciación de la formación del hilo de infección (Limpens et al., 2003). Estos posibles receptores contienen además de su dominio cinasa, dominios extracelulares LysM descritos como dominios de unión a quitinas (oligómeros de *N*-acetilglucosamina similares al esqueleto de los FNs) por su alta identidad con los dominios LysM de una quitinasa de *Volvox carteri* (Amon et al., 1998). Cuando se altera este gen, que es ortólogo de *SYM2* en chícharo, causa un bloqueo en la iniciación de la formación del hilo de infección (Limpens et al., 2003). Los resultados presentados por Ardourel (1994) y Limpens (2003), concuerdan con la hipótesis que el extremo no reductor de los FNs de *S. meliloti* interactúan con *LYK3* y *LYK4* mediante el dominio LysM y que la señal resultante de tal interacción se requiere para iniciar la formación del hilo de infección y para el adecuado crecimiento polar de éste (Gage, 2004).

Dado que la formación de los hilos de infección se inicia solo en pelos en crecimiento, es probable que la misma maquinaria requerida para el crecimiento del pelo radical sea también requerida para el crecimiento del hilo de infección. El pelo radical al enroscarse presenta cambios en el arreglo de sus microtúbulos. Los microtúbulos endoplásmicos asociados al núcleo se alinean a lo largo del eje del pelo radical (Timmers et al., 1999) y en el momento en que se inicia el enroscamiento, los microtúbulos se ubican en el centro del mismo y eventualmente se desconectan de la punta del pelo y se redistribuyen entre el núcleo y la punta del hilo de infección en crecimiento, posteriormente, el hilo de infección sigue al núcleo que se desplaza hacia la base del pelo (Lloyd et al., 1987; Timmers et al., 1999). Durante el crecimiento del hilo de infección, el núcleo del pelo radical se conecta a la punta del hilo por una pequeña y activa columna de flujo citoplásmico. Probablemente esa red de microtúbulos estén involucrados en el flujo citoplásmico que hay entre el núcleo y el hilo en crecimiento (Lloyd et al., 1987).

El número de hilos de infección que se forman en el pelo radical en general excede al número de nódulos que eventualmente se desarrollan. Esto sugiere que la planta puede regular el crecimiento del hilo de infección resultando en el control del número de infecciones. El control

de la planta sobre la infección y la nodulación involucra las respuestas de defensa de la planta y la participación del etileno entre otros (Gage, 2004; Limpens et al., 2003).

Las plantas tienen la capacidad de limitar la propagación de patógenos virales, bacterianos y fúngicos. Las células vecinas próximas a la entrada del patógeno son capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno e inducir la síntesis de compuestos fenólicos y proteínas que modifican la composición de la pared celular y que pueden desencadenar la muerte celular programada (Able, 2003). A esta serie de respuestas se le conoce como “respuesta hipersensible”, algunas de las cuales han sido encontradas durante el establecimiento de la simbiosis entre leguminosas y rizobios (Benaben et al., 1995). Es interesante que las células corticales adyacentes a las células epidérmicas que contienen los hilos de infección, a menudo despliegan características reminiscentes de una respuesta de defensa. Tales células son necróticas, autofluorescentes (indicando que están probablemente enriquecidas en fitoalexinas y compuestos fenólicos) y parecen contener proteínas inducidas durante la respuesta de defensa como glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, fenilalanina-amonialiasa, chalcona sintasa y quitinasas (Perotto et al., 1994; Vasse et al., 1993). Se propone que esta respuesta de defensa, es uno de los mecanismos que regulan el número de infecciones que eventualmente progresan hasta la invasión del primordio de nódulo (Gage, 2004).

Genes expresados durante la Organogénesis del Nódulo

Los FNs inducen la reactivación de la división de las células corticales. Estas células se desdiferencian para formar un meristemo de nódulo en el cual las células se dividen repetidamente para formar un primordio de nódulo y posteriormente un nódulo maduro. En este proceso, las auxinas y las citocininas juegan un papel crucial en el ciclo celular de la planta, el etileno funciona como regulador del desarrollo del nódulo (Pierre et al., 2000), además la nodulina temprana *ENOD40*, se requiere para la inducción de la división celular (Charon et al., 1999).

Los nódulos formados en las raíces de las leguminosas se pueden clasificar en dos tipos: los nódulos indeterminados, en donde la división inicia en las células de la corteza interna (Fig. 5A) y su forma es ovalada (Fig. 5B). En plantas con nódulos indeterminados, el hilo de infección es guiado por una serie de columnas intracitoplásmicas orientadas radialmente conocidas como puente intracitoplásmico o hilo de preinfección. La alfalfa, el chícharo y la arveja son ejemplos de plantas que desarrollan este tipo de nódulos (Fig. 5A y B). Los nódulos determinados son aquellos en los que la formación del primordio del nódulo se inicia en las células de la corteza externa (Fig. 5C), la forma de los nódulos es esférica (Fig. 5D) y no necesariamente forman

hilos de preinfección. El frijol, la soya y lotus son ejemplos de plantas que desarrollan nódulos determinados (van Spronsen et al., 2001) (Fig. 5 C y D).

En el proceso de nodulación, los FNs purificados o la inoculación con los rizobios, inducen la transcripción de algunos genes de la planta. Las proteínas codificadas por estos genes, que son inducidas horas después de la inoculación con rizobios o del tratamiento con los FNs, son llamadas nodulinas tempranas. Las nodulinas tempranas más estudiadas son: ENOD2, ENOD5, ENOD12, ENOD11 y ENOD40 (ENOD por Early Nodulins). La clasificación de las nodulinas en tempranas y tardías se basa en la función de las proteínas a lo largo del proceso de simbiosis.

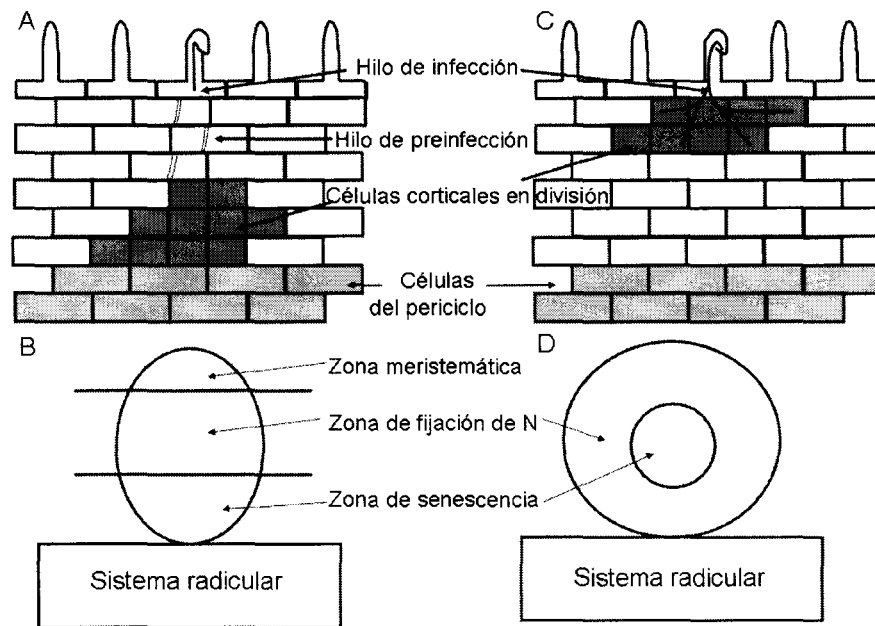


Figura 5. Esquematación de los nódulos indeterminados (A y B) y determinados (C y D). En A y C se muestra las células corticales en división que forman el primordio del nódulo. Los nódulos indeterminados inician en las capas internas del cortex y los determinados en el cortex externo. También se muestra la formación del hilo de infección y ramificación de este; en los nódulos indeterminados el crecimiento del hilo de infección se dirige por el puente intracitoplásmico o hilo de preinfección. En B y D se muestra la formación del nódulo en ambos casos. Los nódulos indeterminados crecen de forma ovalada (B) y los determinados tienen forma esférica (D). Además, se muestran las diferentes zonas del nódulo, como la zona meristemática solo en los determinados, la zona de fijación, donde las bacterias se han diferenciado en bacteroides y que fijan nitrógeno y la zona de senescencia. Modificado de Mylona et al., 1995.

Nodulinas tempranas

Las nodulinas tempranas son aquellas proteínas que se expresan en las primeras etapas de la preinfección, de la infección y durante la organogénesis del nódulo, tales como *ENOD40*, *ENOD2*, *ENOD12* Y *ENOD11*. Algunas mutantes que se encuentran afectadas en los receptores tipo cinasa y que se han postulado como los receptores de los FNs como se describió anteriormente, pueden estar afectadas en la expresión de estas nodulinas tempranas.

En la mayoría de los casos, la aplicación a la raíz de los FNs purificados, es suficiente para activar la transcripción de estas nodulinas, como *ENOD2* en *Glycine soja*, *ENOD11* en *M. truncatula* y *ENOD5* en *Vicia sativa* por mencionar algunas (para una revisión ver Miklasheviks et al., 2001). Es por esto que las nodulinas se han considerado como marcadores moleculares excelentes para el estudio y caracterización de mutantes, toda vez que su expresión es un indicador de una vía de señalización activa.

ENOD40 es una de las nodulinas que se inducen tempranamente en el proceso de organogénesis del nódulo, esto es, desde las 3 horas y 24 horas después de la inoculación en *M. sativa* (Compaan et al., 2001) en *L. japonicus* (Flemetakis et al., 2000) respectivamente. El mRNA de *ENOD40* varía de 500 a 700 bases en las diferentes especies de plantas de leguminosas estudiadas (Compaan et al., 2001; Flemetakis et al., 2000; Matvienko et al., 1994; Papadopoulou et al., 1996). La secuencia de ortólogos de *ENOD40* de algunas leguminosas y no leguminosas muestra que este gen tiene dos marcos abiertos de lectura altamente conservados de los cuales se ha visto que sólo uno de ellos se traduce y probablemente el otro funcione en forma de transcrito (Compaan et al., 2001). El primer marco de lectura, codifica para un péptido muy pequeño de 10 a 13 aminoácidos (Compaan et al., 2001; Kouchi et al., 1999; Papadopoulou et al., 1996; Vijn et al., 1995) y se sugiere que este péptido es una molécula señal necesaria para el inicio de la formación del primordio del nódulo (Charon et al., 1999; Compaan et al., 2001; Flemetakis et al., 2000; Lindsey et al., 2002; Takayama and Sakagami, 2002; Yang et al., 1993). Sin embargo, su expresión no sólo ha sido encontrada en nódulo, sino que también se expresa en otros tejidos de la planta y en otras especies de plantas que no son leguminosas, lo que sugiere que además de que es un péptido esencial del proceso de nodulación, podría tener un papel más general en la fisiología de las plantas (Compaan et al., 2001; Flemetakis et al., 2000; Kouchi et al., 1999; Papadopoulou et al., 1996; Staehelin et al., 2001; van de Sande et al., 1996).

Proteínas ricas en prolina

Existe un gran número de nodulinas ricas en prolina como *ENOD2*, *ENOD5*, *ENOD10*, *ENOD12* y *PRP4*, extensinas, proteínas ricas en glicina (GRPs) y peroxidasas (*rip1*). La expresión de *ENOD12* y *rip1* es inducida por los FNs durante la etapa de preinfección (Cook et al., 1995; Journet et al., 1994). Se ha sugerido que estas proteínas podrían participar en las modificaciones de la pared celular inducida por los FNs. Estos genes se expresan en el primordio del nódulo y en los pelos radicales (Schultze and Kondorosi, 1998).

ENOD2, *ENOD11* Y *ENOD12* son proteínas ricas en prolina localizadas en la pared celular de los nódulos y los hilos de infección (*ENOD11* Y *12*) (Journet et al., 1994; van de Wiel et al., 1990). *ENOD2* es un gen que se expresa durante las etapas tempranas del desarrollo del

nódulo y codifica para una proteína rica en prolina de 74 KDa, con dos pentapéptidos repetidos: ProProHisGluLys y ProProGluTyrGln, además, cuenta con un péptido señal para su transporte a la pared celular y se ha sugerido que son proteínas de la pared de las células del parénquima que rodea el nódulo (van de Wiel et al., 1990). Aunque su función aun es controversial se propone que podría funcionar como una barrera que impide la difusión libre de oxígeno en el nódulo, lo cual favorece la fijación de N₂ (van de Wiel et al., 1990; Witty et al., 1986). Sin embargo, es probable que ENOD2 tenga otra función más bien relacionada con las funciones descritas para las proteínas tipo PRP (proteínas ricas en prolina), tales como respuestas de defensa (Franken and Gnadinger, 1994; Wyatt et al., 1992). El transcrito de ENOD2 se expresa entre 7 y 10 días después de la inoculación y puede ser inducido por la aplicación exógena de citocininas (Dehio and de Bruijn, 1992; Franssen et al., 1990).

La expresión de *ENOD12* está correlacionada con eventos de preinfección, en particular durante la morfogénesis del nódulo. El transcrito se localiza en las células vecinas del hilo de infección y en el primordio del nódulo. *ENOD12* está compuesta al igual que *ENOD2*, de pentapéptidos repetidos con dos hidroxiprolinas (ProProGlnLysGlu y ProProValAsnGly que eventualmente cambia a ProProHisLysLys). El tamaño del mRNA es de aproximadamente 600 pb en chícharo y muestra un extremo 5' no traducido corto de aproximadamente 20 bases. Además, se encontró expresión no simbiótica de *ENOD12* en células del xilema en diferenciación, en primordios de raíces laterales y en tejidos del embrión en desarrollo (Journet et al., 1994). En chícharo existen dos genes de *ENOD12* que se expresan en nódulos pero también en tallo de plantas no inoculadas (Scheres et al., 1990). En *M. sativa* también se encontraron dos genes de *ENOD12* los cuales tienen un alto nivel de homología con los descritos para chícharo, y su expresión se observa desde las 2 horas después de la inoculación (Allison et al., 1993; Pingret et al., 1998). Es interesante mencionar que esta nodulina también se expresa en raíces en respuesta a micorrización. Por otro lado, *ENOD11* es una proteína también rica en prolina, utilizada muy frecuentemente para la caracterización de mutantes resistente a la micorrización (*myc*), ya que se expresa en respuesta tanto a la inducción bacteriana como micorrízica. Su tamaño es aproximadamente dos veces más grande que el de *ENOD12* y sus pentapéptidos repetidos con prolinas son extremadamente variables. *ENOD11* se expresa generalmente en la zona de emergencia de los pelos radicales. Además se ha encontrado en tejido no simbiótico. Debido a que se detecta en zonas donde se desarrollan los hilos de infección, también se le ha relacionado con este proceso, sin embargo, su expresión se observa a lo largo del desarrollo del nódulo (Amor et al., 2003; Journet et al., 2001). La expresión de *ENOD11* inicia desde las 3 y las 6 horas posteriores a la inoculación con el rizobio, y por RT-PCR se detecta la acumulación de su mensajero a las 2 semanas después de la infección con micorrizas (Journet et al., 2001). Este patrón de expresión sugiere un papel

importante de *ENOD11* durante la simbiosis, ya que la proteína *ENOD11* confiere propiedades específicas a la pared celular. Su función se desconoce, sin embargo, es un marcador excelente de respuesta al rizobio y a la infección por micorrizas. Resumiendo, tanto *ENOD11* como *ENOD12* parecen estar involucrados en las modificaciones de la pared del pelo radical que conlleva a la penetración de la bacteria o bien en la síntesis de nuevos componentes requeridos para la matriz del hilo de infección (Journet et al., 1994; Scheres et al., 1990).

Muchos de los genes de nodulinas tempranas incluyendo *ENOD12*, *ENOD10*, *ENOD11* y *MtPRP4* codifican para proteínas ricas en prolina (PRPs) que son miembros de la superfamilia de extensinas de pared celular. Con excepción de *ENOD12*, cada una de esas PRPs incluye una serie de motivos pentaméricos que contienen tirosinas que han sido implicadas en el entrecruzamiento de proteínas de pared celular por un proceso que involucra peroxidasas de unión a pared celular y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno).

De las nodulinas descritas a la fecha, existe otra muy interesante y que diversos autores sugieren que está involucrada con los eventos de preinfección, ésta es una peroxidasa específica del proceso de la interacción planta-rizobio y se le ha denominado G2All (*rip1*). Esta peroxidasa contiene una región conservada en más de 30 peroxidasas de plantas. Análisis de expresión indican la presencia basal de este mensajero, la cual aumenta de las 3 horas posteriores a la inoculación de *M. truncatula* con el rizobio o con los FNs purificados. A las 24 horas presenta un nivel máximo de expresión, lapso en el cual la deformación del pelo radical tiene lugar y a las 48 horas empieza a disminuir su expresión. Es importante mencionar que su expresión disminuye al mismo tiempo que *ENOD11* y *ENOD12* la aumentan. Además, la transcripción de *rip1* y la producción de EROs presentan el mismo patrón de expresión espacial y temporal (Ramu et al., 2002). El entrecruzamiento oxidativo de proteínas de pared celular involucra potencialmente a la peroxidasa Rip1 y podría ser importante en los sitios de formación del hilo de infección o en células en división durante el desarrollo del nódulo. La coincidencia física de que la proteína Rip1 y sus proteínas sustrato (PRPs) puedan proveer un mecanismo de modificación de pared celular que podrían ser activados en sitios específicos por producción de peróxido de hidrógeno, Rip1 podría facilitar la infección contribuyendo a reparar la pared celular en el sitio posible de infección o para la formación de nuevas estructuras de pared celular, por ejemplo las asociadas con pelos radicales susceptibles ya que las PRPs son abundantes en el hilo de infección (Cook et al., 1995).

Posibles papeles de las ERO durante la simbiosis

La generación de ERO puede ocurrir muy tempranamente en el proceso de nodulación. El gen *Rip1* de *M. truncatula* se induce a tiempos tempranos (Cook et al., 1995) en la zona de la raíz que es más susceptible a la deformación de los pelos radicales y a la infección. Es

interesante que esta misma zona es la más activa en la producción de ERO (Ramu et al., 2002). Es factible proponer que la producción de ERO y la inducción de genes que codifican para peroxidasas durante las etapas tempranas de la simbiosis, se encuentren involucradas en el control del crecimiento, deformación y enroscamiento de pelos radicales y además en respuesta de defensa en plantas leguminosas que pueden afectar la iniciación y progresión de los hilos de infección en las capas celulares corticales (Gage, 2004). Alternativamente, las ERO podrían tener un papel crítico durante la infección y organogénesis del nódulo, por ejemplo, proveyendo oxidantes para la modificación de pared celular (Ramu et al., 2002). Finalmente, las ERO pueden tener un papel directo en la regulación de proteínas de señalización en plantas. El potencial redox puede tener efectos dramáticos en el plegado y en la función de las proteínas incluyendo la actividad de los factores de transcripción y de pequeñas proteínas de unión a GTP, así como influenciar en el equilibrio de la fosforilación que regula diversos aspectos de la función celular eucariótica.

La simbiosis leguminosa-rizobio comparte características en común con algunas interacciones planta-patógeno. Estas características incluyen la especificidad del genotipo por elicitores microbianos y la redirección del metabolismo del hospedero. Los FNs disparan respuestas de defensa del hospedero en una manera análoga a elicitores patógenos. Algunos estudios muestran que los elicitores provenientes de patógenos pueden inducir muchas de las mismas respuestas fisiológicas inducidas por los FNs incluyendo despolarización de la membrana, alcalinización extracelular transitoria, cambios en los flujos iónicos y la inducción de genes de respuesta del hospedero (Cook et al., 1995; Ramu et al., 2002). Una posibilidad intrigante para explicar este hecho es que las respuestas de las leguminosas inducidas por los FNs pueden ser derivados de una vía antigua conservada de respuestas de las plantas a ciertas clases de elicitores patógenos (Cook et al., 1995; Ramu et al., 2002).

Nodulinas tardías

Las nodulinas tardías se expresan cuando el nódulo está bien desarrollado y es capaz de fijar nitrógeno, ejemplo de éstas es la leghemoglobina (LB). Otros ejemplos de nodulinas tardías son la glutamino sintasa, la sacarosa sintasa y la uricasa. La LB en *V. sativa* es una proteína que se expresa en respuesta a la presencia de FNs (3 horas después del tratamiento), antes de la deformación de los pelos radicales, sin embargo, se le ha considerado una nodulina tardía porque su función es muy clara durante la fijación de nitrógeno (Heidstra et al., 1994; Heidstra et al., 1997). En *L. japonicus* se induce rápidamente, esto es a las 24 horas después del tratamiento con los FNs (Stracke et al., 2002). Es interesante mencionar que las mutantes en los receptores tipo cinasa con dominios LRR, (SYMRK y NORK) no inducen la expresión de esta nodulina, por lo que su expresión depende de la presencia de los FNs. Con base en estos

datos, es plausible proponer que las nodulinas tardías también son marcadores moleculares de la morfogénesis del nódulo que pueden ser utilizadas como herramientas importantes para la caracterización de mutantes de la planta con un fenotipo *nod*⁻.

Simbiosis Planta-Micorriza Arbuscular (MA)

Las asociaciones endomicorrízicas tienen lugar en más del 80 % de las plantas con flores de la tierra y son evolutivamente muy antiguas. El hongo obligadamente biotrófico coloniza las células de la raíz con la finalidad de obtener carbono de la planta hospedera. Durante el crecimiento de la raíz, los hongos también desarrollan una red de hifas externas, las cuales absorben y proporcionan fosfato y otros nutrientes minerales del suelo a la raíz. La simbiosis con MA es esencialmente no específica y una sola especie de hongos tiene la capacidad de colonizar muchas especies de plantas (Harrison, 2005).

Infección por Micorrizas Arbusculares

Los pasos generales del proceso de interacción entre hongos MA y una planta inician cuando una hifa proveniente de una espora en germinación (Fig. 6a-c) hace contacto con la raíz hospedera. La penetración del hongo a la raíz ocurre vía una estructura llamada apresoria (Fig. 6d) y el hongo frecuentemente entra forzando su entrada entre dos células epidérmicas, de esta manera se interna al parénquima cortical. Esta es la primera indicación del reconocimiento entre el hongo y la planta hospedera ya que las apresorias no se forman en plantas no hospederas. Posteriormente se inicia la proliferación de las hifas de manera intercelular (Fig. 6e). El desarrollo de la infección micorrízica culmina en la diferenciación de haustorias intracelulares conocidas como arbusculos (Fig. 6f) que llegan a colonizar las células del parénquima cortical, pero no infectan células del sistema vascular. Los arbusculos aumentan la superficie de contacto con el protoplasto vegetal y tienen un papel clave en el intercambio recíproco de nutrientes entre las células vegetales y los hongos. Sin embargo, los arbusculos son estructuras efímeras ya que se desarrollan ciertos días y después inicia la senescencia, en este momento, el material fibrilar vegetal encapsula la estructura fúngica colapsada (Gianinazzi-Pearson, 1996). El desarrollo de las MA continúa dentro del sistema radical al mismo tiempo que se extienden a nuevas raíces emergentes, de esta forma, la colonización del hongo ocurre concomitantemente en diferentes raíces de una manera no sincronizada (Fig. 6g).

La adaptación celular necesaria para la integración morfológica y la compatibilidad recíproca entre las células vegetales y las fúngicas en MA debe depender de procesos de reconocimiento fino y altamente evolucionado. El intercambio de señales y reconocimiento entre

las plantas hospederas y los hongos MA inicia antes de que entren en contacto físico. Los metabolitos exudados por las raíces hospederas, aumentan específicamente la germinación de las esporas y el crecimiento del hongo comparado con exudados de raíces de plantas no hospederas, las cuales no ejercen dicho efecto (Bécard et al., 1995; Phillips and Tsai, 1992). Dichas moléculas vegetales activas no se han identificado, sin embargo se propone a los flavonoides como candidatos, aunque no son esenciales en las interacciones hongo-hospedero (Bécard et al., 1995; Phillips and Tsai, 1992). Existe un componente difusible del hongo, decubierto al colocar una barrera física (por ejemplo membranas de celofán) entre las hifas y la planta (*M. truncatula*), que induce la expresión de *ENOD11* (Kosuta et al., 2003). Sin embargo, no se ha identificado su estructura química y mutantes de *M. truncatula* que son incapaces de nodular y micorrizar, inducen una baja expresión de *ENOD11* (Kosuta et al., 2003).

El fenómeno de reconocimiento más temprano en el hongo es la ramificación de las hifas inducida por la planta hospedera seguida por la formación de las apresorias en la superficie de la raíz (Fig. 6c y d). Estas respuestas pueden ocurrir a las 36 horas después de la inoculación de la planta hospedera. Las células de la epidermis e hipodermis en contacto con esas primeras estructuras de infección, no muestran modificaciones citológicas significativas o respuestas típicas de defensa de la planta. Posteriormente los hongos invaden la raíz inter- y extracelularmente (Fig. 6e y f). La reacción de la planta a una hifa que atraviesa una célula hipodérmica o epidérmica induce el desarrollo de una membrana derivada del hospedero y la deposición continua de material de pared celular alrededor del hongo.

La progresión de la ramificación del hongo en la célula hospedera provoca la síntesis *de novo* de la membrana periarbuscular (MPA). La MPA es derivada de membrana plasmática vegetal periférica y rodea completamente el arbusculo. La superficie de contacto resultante entre el protoplasto de la planta y los hongos crean la interface simbiótica, una zona apoplástica especializada para intercambio de nutrientes entre los simbioses. En las células del parénquima cortical, este material de pared se adelgaza progresivamente alrededor de los hongos en crecimiento para formar una matriz de fibrillas desorganizadas que separan la MPA de la pared arbuscular creando una zona interfacial de menos de 10 nm. La variación en los componentes de la interfase entre diferentes plantas refleja diferencias en el grupo de elementos de la pared celular vegetal.

La MPA no es estructural o citoquímicamente diferente a la membrana plasmática periférica y la evidencia de que es una membrana activa resulta de la observación de actividades de H^+ -ATPasa y fosfatasa. Existen evidencias de que los genes que codifican la H^+ -ATPasa de membrana plasmática son regulados durante las interacciones MA (Murphy and Smith, 1996).

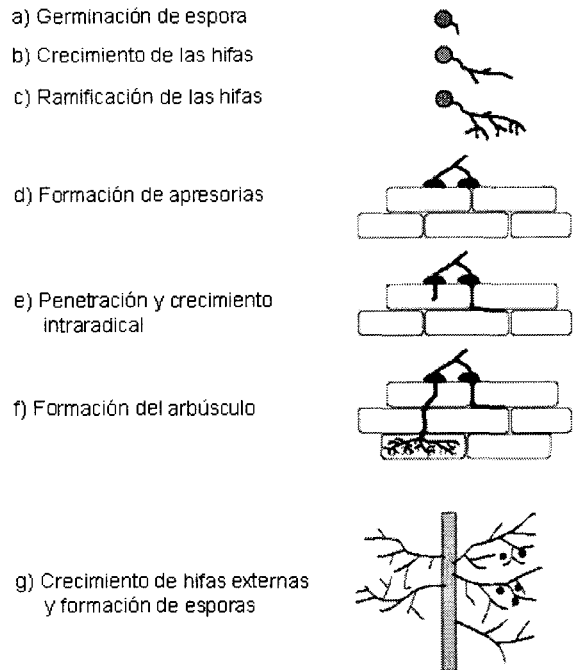


Figura 6. Proceso de infección por hongos para inducir micorrizas arbusculares en las raíces de plantas superiores. a) Germinación de la espora. b) Crecimiento de las hifas. c) Ramificación de las hifas. Estos pasos son acelerados por los exudados liberados de las raíces de las plantas. En d), se muestra la formación de las estructuras denominadas apresorias que son el producto del primer contacto físico entre la raíz de la planta y el hongo MA. En e), se muestra la internalización del hongo de forma intercelular, posteriormente el hongo forma intracelularmente una estructura llamada arbusculo, f), y es en esta estructura en la cual se inicia el transporte de nutrientes entre ambos simbioses. Una vez que colonizaron diferentes áreas de las raíces, las hifas salen de la raíz y entran a otras raíces (g). Modificado de Marsh y Schultze 2001.

La organización citoplásmica, la pared y la membrana de las células vegetales invadidas por arbusculos, se altera debido a modificaciones en los componentes del citoesqueleto. La vacuola disminuye en tamaño y el volumen relativo del citosol incrementa y los organelos celulares (mitocondrias, plástidos, dictiosomas y retículo endoplásmico) proliferan. Concomitantemente con el desarrollo arbuscular, en la planta, el núcleo se mueve al centro de la célula y presenta hipertrofia (Balestrini et al., 1992). Existe evidencia de que la reorganización de los contenidos celulares del hospedero requiere la síntesis de componentes del citoesqueleto como lo demuestra la activación del gen de α -tubulina de células colonizadas (Bonfante et al., 1996). El núcleo de la célula vegetal se caracteriza por un incremento de fluorocromo, sensibilidad a las nucleasas y descondensación de la cromatina, los cuales indican una alta actividad transcripcional (Berta et al., 1990; Sgorbati et al., 1993). Muchos de los genes inducidos durante la formación de micorrizas y que son comunes a los inducidos a la respuesta a patógenos se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Genes que se activan por MA y que son comunes de defensa patógeno

<i>Genes activados durante la interacción</i>	<i>Referencia</i>
Genes de proteínas PR (Resistencia a patógenos), <i>pr-1</i>	(Collinge et al., 1994)
<i>gst</i> (Glutación-S-transferasa)	(Strittmatter et al., 1996)
Genes de quitinasas	(Volpin et al., 1994)
β -1,3 <i>glucanasa</i>	(Collinge et al., 1994)
Genes de proteínas ricas en hidroxiprolina	(Franken and Gnadinger, 1994)
α - <i>tubulina</i>	(Bonfante et al., 1996)
<i>chs</i> (Chalcona sintasa)	(Harrison and Dixon, 1993)
<i>chi</i> (Chalcona isomerasa)	(Harrison and Dixon, 1993)
<i>pal</i> (Fenilalanina amonio-liasa)	(Harrison and Dixon, 1993)
Genes de fitoalexinas	(Harrison and Dixon, 1993; Smith, 1996)

En el contexto de toda la planta, el tejido micorrízico funciona predominantemente, como una fuente de carbono suplido como fotosintato de la planta para el hongo y como una fuente de fosfato transportado del suelo por el hongo hasta las raíces vía hifas fungales y proporcionados a la planta (Shachar-Hill et al., 1995).

Eventos comunes en los procesos de nodulación y micorrización

Se han identificado eventos similares entre la interacción leguminosa-rhizobia y planta-hongo micorrízico. Esto ha permitido sugerir que estas dos interacciones comparten algunos eventos de señalización y que algunos de los mecanismos por los cuales los microsimbiontes colonizan la planta son comunes. Entre estos mecanismos, se ha reportado que los flavonoides activan la transcripción de los genes *nod* en la bacteria, y en los hongos aumentan la velocidad de crecimiento de las hifas y aceleran la germinación de las esporas (Xie et al., 1995). Aunado a esto, la expresión de algunos genes activados en el proceso de nodulación como *ENOD11*, *ENOD12*, *ENOD40*, *ENOD2*, *ENOD5*, *LB* y la nodulina 26 también se expresan en respuesta a micorrizas, además, se ha determinado que la sobreexpresión de *ENOD40* induce el aumento de la colonización micorrízica estimulando el crecimiento fúngico y aumentando el número de arbusculos (Fruhling et al., 1997; Gianinazzi-Pearson, 1996; Journet et al., 2001; Staehelin et al., 2001; van Rhijn et al., 1997). Por otro lado las células del parénquima cortical son blanco para el desarrollo de las estructuras arbusculares así como para la organogénesis del nódulo y la colonización bacteriana. También se ha reportado que en ambos sistemas, existe la activación de la síntesis de membrana derivada de la planta que rodea ya sea la estructura arbuscular o bacteroidal (Mellor, 1989).

Mutantes micorrízicas

Algunas mutantes alteradas en los eventos de nodulación también se han caracterizado en los eventos de micorrización (ver Tabla 3). De estas, se han descrito dos fenotipos: el primero Myc^{-1} en donde la asociación es bloqueada en una etapa temprana y el hongo es capaz de crecer en la superficie de la raíz y formar apresorias, sin embargo, la penetración no ocurre (Fig. 7b). La segunda clase es Myc^{-2} donde el hongo es capaz de formar apresorias y penetra a la raíz de forma intercelular pero es incapaz de formar arbusculos y vesículas arbusculares (Fig. 7c) (Gianinazzi-Pearson, 1996; Harrison, 1997). También se ha descrito otra variación del fenotipo Myc^{-2} , en el que las raíces se colonizan por arbusculos pero con menor frecuencia, a esta variación se le denomina Coi^{-} (ausencia de la invasión del cortex, ver tabla 3) (Wegel et al., 1998).

La mayoría de las mutantes Myc^{-1} inducen respuestas de defensa en la planta justo debajo de las apresorias. Debido a que estas respuestas no se encuentran en la planta de tipo silvestre (TS), se sugiere que estas plantas Myc^{-1} reconocen a los hongos como un patógeno, y no como simbiote, lo cual genera una respuesta de defensa que impide la formación de micorrizas (Harrison, 1997) (ver fig. 7).

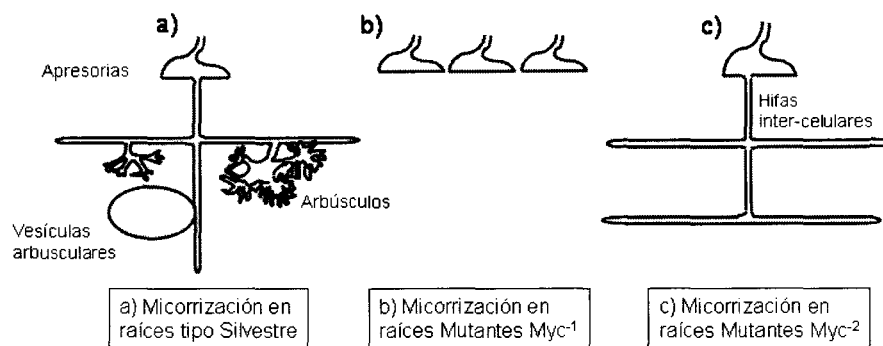


Figura 7. Esquema que muestra los distintos fenotipos de varias mutantes y comparados con las raíces se TS (a). En b) mutantes Myc^{-1} , las cuales se caracterizan porque forman solamente las apresorias pero el hongo no logra internalizarse. En mutantes Myc^{-2} (c) el hongo se internaliza a las capas celulares internas, sin embargo, no logra invadir la célula formando arbusculos. Modificado de Harrison, M., 1997.

Existen aproximadamente 25 mutantes isogénicas no-nodulantes de chícharo y de *M. truncatula* resistentes a la infección por MA. El fenotipo resistente a MA de esas mutantes, designado Myc^{-1} , es el más frecuente entre las mutantes incapaces de nodular. Las mutaciones Myc^{-1} afectan específicamente las interacciones de la planta con MA y con rizobia, sin embargo, no están correlacionadas con cambios en los patrones de infección de hongos, bacterias o nemátodos patógenos de la raíz. El estudio genético de la determinación del carácter Myc^{-1} en chícharo muestra que las mutaciones están en un solo locus y que pertenecen a tres grupos de complementación, los cuales corresponden a los genes de nodulación *sym8*, *sym19* y *sym30*.

Para cada grupo de complementación, la mutación es recesiva y genéticamente estable y el carácter *Myc*⁻¹ no segrega del carácter *Nod*⁻ en progenies F2, lo cual sugiere que un gen controla ambos caracteres (Duc et al., 1989).

Tabla 3. Mutantes descritas en Nodulación y Micorrización.

Chicharo (<i>P. sativum</i>)	Fenotipo		Observaciones	Referencia
<i>sym10</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		(Duc et al., 1989)
<i>sym35</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺	EPR ⁺ excesivo	(Borisov et al., 2003)
Soya (<i>G. max</i>)				
<i>nod49</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		(Wyss et al., 1990)
<i>nod139</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		
Frijol (<i>P. vulgaris</i>)				
R99	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		Desarrolladas por (Park and Buttery, 1992) de la variedad OAC Rico.
R69	<i>Nod</i> ⁺ / <i>Fix</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻²	DPR ⁺ , EPR ⁺ , FHI ⁻ estruc. tipo nódulo	
<i>sym-1</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		Variedad RIZ30
<i>sym-2</i>	<i>Nod</i> ⁻			(Davis et al., 1988; Pedalino et al., 1992; Pedalino et al., 1993) (Ibijbjen et al., 1996)
Lotus japonicus				
<i>Ljsym72</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		(Senoo et al., 2000)
<i>Ljsym71-1</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		
<i>Ljsym71-2</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		
<i>Ljsym2</i>	<i>Nod</i> ⁻	* <i>Myc</i> ⁺	Pocos arbúsculos	(Wegel et al., 1998)
<i>Ljsym3</i>	<i>Nod</i> ⁻	* <i>Myc</i> ⁺	Pocos arbúsculos	
<i>Ljsym4-1</i>	<i>Nod</i> ⁻	* <i>Myc</i> ⁺	Pocos arbúsculos	
<i>Ljsym4-2</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻²		(Bonfante et al., 2000)
<i>Ljnin</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺	DPR ⁺ , EPR ⁺	(Lum et al., 2002b)
<i>Nfr-1</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		(Radutoiu et al., 2003)
<i>Nfr-5</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		
<i>SYMRK (cac41.5)</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		(Stracke et al., 2002)
Medicago sativa				
<i>NORK (MN-1008)</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		(Endre et al., 2002)
<i>castor-1</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		(Imaizumi-Anraku et al., 2005)
<i>pollux-1</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		(Imaizumi-Anraku et al., 2005)
Medicago truncatula				
<i>nfp</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		(Amor et al., 2003)
<i>dmi1</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		(Catoira et al., 2000)
<i>dmi2</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		(Catoira et al., 2000)
<i>dmi3</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		(Catoira et al., 2000)
<i>nsp</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺		(Catoira et al., 2000)
Melilotus alba				
<i>sym1</i> (BT62)	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺	FHI ⁻ , Nódulos inefectivos	(Lum et al., 2002b; Utrup et al., 1993)
<i>sym1</i> (BT58,BT35)	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻		
<i>sym2</i> (BT59)	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁺	DPR ⁺ , FHI ⁺ , nod. inefectivos	
<i>sym3</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻	DPR ⁺	
<i>sym4</i>	<i>Nod</i> ⁻		EPR ⁺ , FHI ⁺	
<i>sym5</i>	<i>Nod</i> ⁻	<i>Myc</i> ⁻	DPR ⁺ , RPR ⁺ , nod. inefectivos	

DPR⁺: Deformación de pelos radicales
EPR⁺: Enroscamiento de pelos radicales
RPR⁺: Ramificación de pelos radicales
FHI⁺: Formación del hilo de infección

*: Nuevo fenotipo de mutantes micorrízicas en las que sí existe formación de arbúsculos pero en menor cantidad, los autores le nombraron, ausencia de la invasión de las células del cortex.

La existencia de muchas mutantes con fenotipo Nod⁻/Myc⁻ y otras Nod⁻/Myc⁺, sugiere que las dos vías simbióticas comparten un cierto número de pasos en las etapas iniciales de la interacción o alternativamente, que algunas proteínas son agrupadas junto a un complejo receptor, que podrían ser usadas en ambas asociaciones planta-microbio (Lum et al., 2002a). Resulta interesante que no haya mutantes que presenten un fenotipo Nod⁺ y Mic⁻, lo cual permitiría tener una idea más profunda de los receptores de las señales liberadas por el hongo o bien de los efectores, responsables de la inducción de los genes requeridos para las micorrizas.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

Caracterización de mutantes de leguminosas durante la simbiosis

Hipótesis

Objetivo General

Objetivos Particulares

ANTECEDENTES

Caracterización de mutantes de leguminosas durante la simbiosis

La generación de una gran variedad de leguminosas para el estudio del proceso de la simbiosis *leguminosa-rhizobia* es una herramienta muy útil para estudiar los mecanismos de la planta involucrados en la interacción simbiótica leguminosa-rizobio. Como resultado del uso del agente mutágeno EMS (Etil Metano Sulfonato) que induce mutaciones puntuales al azar, se generaron un amplio rango de mutantes que puede tener desde una función disminuida, hasta una aumentada o alterada (Penmetsa and Cook, 2000; Szczyglowski et al., 1998; Wopereis et al., 2000).

En *L. japonicus* existen diferentes variantes mutantes simbióticas estables (Szczyglowski et al., 1998). Una de estas mutantes, presenta un fenotipo hipernodulante cuando se inocula con su simbionte correspondiente, *M. loti* NZP2235, así como una inhibición en el crecimiento de la raíz y del tallo (Szczyglowski et al., 1998). Los autores propusieron que una mutación en un sólo gen es capaz de afectar ambos fenotipos: el desarrollo de las raíces y el fenotipo simbiótico, sugiriendo un mecanismo común de regulación en el desarrollo de la raíz y la formación de nódulos. Recientemente se mapeó esta mutación la cual corresponde a un receptor tipo serina/treonina cinasa involucrado en la regulación del crecimiento de la raíz, del número de nódulos (desde el brote de la planta) y además, está involucrado en la sensibilidad al nitrato durante el desarrollo simbiótico mediante una señal que es transportada desde el brote (Nishimura et al., 2002).

Existe una gran variedad de leguminosas mutantes alteradas en el proceso de simbiosis en las diferentes pasos de la nodulación (ver Tabla 3) que además resultan estar afectadas en el proceso de micorrización, sugiriendo así que estos dos procesos se encuentran compartiendo algunos eventos en la vía de señalización. Estas mutantes en leguminosas modelos como *Medicago truncatula* y *Vicia sativa*, están afectadas en diferentes pasos de la nodulación y la formación de micorrizas y gracias a ellas se han logrado identificar diferentes componentes de la vía de transducción de señales que se activa mediante la percepción de los FNs (Endre et al., 2002; Imaizumi-Anraku et al., 2005; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Stracke et al., 2002).

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en el estudio de la relación simbiótica de *Phaseolus vulgaris* (frijol) y *Rhizobium etli*, especialmente durante los eventos tempranos de la interacción. *P. vulgaris* es una planta leguminosa que establece una interacción simbiótica con *R. etli* y forma nódulos determinados (ver Figura 5C y D).

En este trabajo hemos iniciado la caracterización de una mutante de frijol NN-DOR364 incapaz de nodular (Nod⁻). Esta mutación inicialmente se obtuvo en el fondo genético RIZ30, la cual se denominó NOD125 (Davis et al., 1988) y fue seleccionada por presentar un fenotipo Nod⁻ (no nodulación). La mutante NOD125 posteriormente llamada *sym-1*, presentó herencia monogénica recesiva (Pedalino et al., 1992). Esta mutación se transfirió al fondo genético de la variedad DOR364, generando así la línea DOR364 no nodulante (NN-DOR364), estas líneas nos fueron facilitadas por el Dr. Jorge Acosta. Debido a que no existe una caracterización genética de la mutante NN-DOR364 a nivel de interacción planta-simbionte en los eventos tempranos, y mucho menos una caracterización celular y molecular, iniciamos la caracterización en las raíces de las plantas mutante y de TS, en respuesta a la inoculación con *R. etli* o al tratamiento con los FNs purificados a distintos niveles del proceso de nodulación (Tesis de Lic. (Alemán, 2002). La línea mutante NN-DOR364 presenta incapacidad para activar la división celular indispensable en la formación del primordio, y no hay formación del hilo de infección en respuesta a la inoculación con la bacteria como normalmente ocurre en las plantas de TS. Sin embargo, cuando se trataron plántulas de TS y mutante con FNs purificados, se encontró que los pelos radicales de la línea mutante NN-DOR364 responden de forma similar a la de TS con hinchazón, ramificación y bifurcación, pero no con enroscamiento de los mismos.

En la mutante de *L. japonicus* para el gen *SYMRK* que está afectada en un receptor tipo cinasa, los pelos radicales responden con hinchazón y ramificación en respuesta a la bacteria pero no responden con enroscamiento y son incapaces de nodular. Además, esta mutante no tiene la capacidad de ser infectada por micorrizas, como ya se mencionó en la introducción. Sin embargo, existen muchas mutantes que no nodulan y siguen manteniendo la capacidad de poder ser micorrizadas. Esto sugiere que los mecanismos de señalización de la nodulación e infección por micorrizas, están relacionados, pero también presentan puntos específicos en la señalización (Stracke et al., 2002). Eventos aun más tempranos que la deformación de los pelos radicales como los influxos y las oscilaciones de calcio pueden servir como herramientas adicionales que nos permitan caracterizar las mutantes de una manera mas fina y contribuir al entendimiento en la percepción de los FNs y la cascada de señalización.

Debido a que nuestro interés es contribuir en la disección de los eventos de señalización que inducen las señales bacterianas (FNs) en los pelos radicales de leguminosas, en este trabajo se aborda el estudio de los eventos tempranos de la nodulación, específicamente, la respuesta morfológica y celular de los pelos radicales de *P. vulgaris* en presencia de los FNs y de *R. etli*. Además, se planea estudiar si existe el aumento en los niveles de calcio intracelular y las oscilaciones de éste ión en los pelos radicales de la línea mutante NN-DOR364 incapaz de nodular como una de las primeras respuestas que ocurren en los pelos radicales de leguminosas después de la percepción de los FNs (ver tabla 1). También planeamos determinar

la expresión de algunas nodulinas tempranas y tardías que normalmente se inducen durante la nodulación y que podrían estar afectadas en la línea mutante NN-DOR364. Finalmente, nos interesa saber si la línea mutante aun retiene la capacidad de poder formar micorrizas.

Hipótesis:

La línea mutante de frijol NN-DOR364 incapaz de nodular, se encuentra alterada en la vía de transducción de señales específica de los FNs y no de los elicitores micorrízicos, que da como resultado una disminución en la expresión de algunas nodulinas involucradas en la activación del promordio del nódulo, la organogénesis y la función del nódulo.

Objetivo General:

Caracterización de las respuestas tempranas de una línea mutante de frijol incapaz de nodular NN-DOR364 en la interacción simbiótica con *Rhizobium etli*.

Objetivos Particulares:

- Analizar el patrón de segregación de genes de nodulación en la línea mutante.
- Análisis del patrón de expresión de algunas nodulinas tempranas (*ENOD2*, y *ENOD40*) y una nodulina tardía (Leghemoglobina) en respuesta a la inoculación con *R. etli* de la línea mutante en función de la línea parental de TS.
- Determinación del aumento de Ca^{2+} intracelular en pelos radicales de la línea de TS y mutante en respuesta al tratamiento con los FNs.
- Determinar si la línea mutante de frijol es susceptible a la infección por hongos MA (*Glomus intraradices*).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Variedad de frijol DOR364

Germinación de semillas

Análisis genético de la línea mutante NN-DOR364

Montaje de plántulas de frijol para la determinación del Calcio intracelular

Microinyección de pelos radicales

Incubación de los pelos radicales con FNs

Adquisición y Procesamiento de Imágenes

Inoculación de plantas de frijol con *Rhizobium etli*

Expresión de Nodulinas en respuesta a *R. etli* y *G. intraradices*

Extracción y Transferencia de RNA

Preparación de sondas

Experimentos tipo *Northern*

Infección por Micorrizas (*Glomus intraradices*)

Tinción de raíces colonizadas por *G. intraradices*

METODOLOGIA

Para determinar las respuestas tempranas en la línea mutante NN-DOR364 durante la interacción con *R. etli* y los FNs, se establecieron primeramente las condiciones experimentales de germinación, infección con *R. etli* y *G. intraradices*. También se determinaron los patrones de expresión de algunas nodulinas tempranas en la planta TS y se compararon con los de la línea mutante.

Variedad de Frijol DOR364

Variedad de alto rendimiento y amplia adaptación

Variedad desarrollada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), usando como progenitores al DOR 1215 x (RAB 166 x DOR 125).

DOR 364 se adapta a un amplio rango de ambientes y suelos, aunque se comporta mejor en suelos francos. Deben evitarse los suelos pesados o arcillosos.

Tolera altas temperaturas por periodos cortos. Es resistente y/o tolerante a enfermedades causadas por hongos y virus.

La variedad tiene alto rendimiento y es estable. Su porte erecto evita que las vainas entren en contacto con el suelo, reduciendo así las pérdidas y mejorando la calidad del grano.

Características Agronómicas

Hábito de crecimiento	Arbustivo guía larga
Días de floración	36-38
Días de madurez fisiológica	75-80
Días a cosecha	80-85
Vainas/planta	12
Semilla/vaina	6
Color del grano	rojo oscuro
Color de la vaina	rosadas estriadas
Floración completa	35-37 días
Forma del grano	alargado
Rendimiento	25-35 qq/mz
Resistente a	Mosaico dorado, Mosaico común
Tolerante a	Mustia hilachosa y Bacteriosis
Susceptible a	sequía

Zonas recomendadas para la siembra

Carazo, Granada, Masaya, Rivas, Jalapa, Matagalpa, Jinotega, Santa Lucía, Nueva Guinea El Rama y San Carlos.

Recomendaciones agronómicas

Distancia entre surcos 50-55 cm (20-22 pulgadas) Se recomienda utilizar de 80-100 libras de semilla por manzana. Fertilización: Aplicar 1 qq/mz de la fórmula 18-46-0 ó 10-30-10.

El control de malezas debe efectuarse en los primeros 30 días después de la siembra, usando herbicida o machete.

(Fuente de información: INTA)

** 1 manzana (mz) equivale a 0.08 hectáreas*

Germinación de semillas

Las semillas de las líneas mutante y silvestre se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio al 20%, después se lavaron 3 veces con agua de la llave la que se usó estéril, y se dejaron con alcohol absoluto por 1 minuto. Después se lavaron nuevamente con agua de la llave y estéril 3 veces o hasta quitar todo el residuo de alcohol. Posteriormente se dejaron embebidas en agua por 24 horas (este paso es muy importante para esta variedad de frijol), y se lavaron nuevamente. Finalmente las semillas estériles se colocaron en charolas para su germinación por 48 horas sobre papel absorbente húmedo (todo en condiciones de esterilidad) y dentro de una cámara de crecimiento a 28 °C.

Análisis genético de la línea mutante NN-DOR364

Las plántulas germinadas en charolas se pasaron a macetas para este experimento. Se llevaron a cabo cruza con la finalidad de analizar la segregación de los genes de esta línea mutante. La estrategia que se siguió es primeramente la cruza de la línea parental de TS (estigma) X la línea mutante NN-DOR364 mutante (polen). Esta cruza se realizó en ambas direcciones teniendo como resultado en la primera generación (F1) el 100 % de plantas heterocigotas con el fenotipo del alelo dominante. Posteriormente, las semillas de la generación F1 se sembraron para determinar el fenotipo y estas a su vez se autopolinizaron para obtener la F2. La generación segregante se utilizó para determinar si el fenotipo de esta mutante NN-DOR364 se debe al efecto de un solo gen o varios genes dependiendo de la proporción de plantas nodulantes y no nodulantes. Al analizar la proporción de plantas F2 nodulantes y no-nodulantes se determinó el comportamiento de este carácter.

Para confirmar estos resultados, se realizaron retrocruzas entre la generación F1 y cada progenitor de la F1 por separado. Si se cruza la F1 con la línea del fenotipo dominante, el resultado esperado es de 100 % con fenotipo dominante. Si se cruza la F1 con la línea del

fenotipo recesivo se obtiene una proporción 1:1 (dominante: recesivo). Las plantas de la generación F1 y F2 se inocularon con *R. etli* y se crecieron en ausencia de nitrógeno para hacer observar el fenotipo de nodulación, las plantas no nodulantes en estas condiciones son generalmente cloróticas, mientras que las que tienen el fenotipo silvestre presentan hojas muy verdes.

Montaje de plántulas de frijol para la determinación del calcio intracelular

Las plántulas de la línea mutante NN-DOR364 y las de TS germinadas por 48 horas se transfirieron a cajas Petri con medio Fåhræus (CaCl₂ 90 mM, MgSO₄ 58.8 mM, KH₂PO₄ 73 mM, Na₂HPO₄ 1.08 mM, FeC₆H₅O₇ 204 mM, MnSO₄ 120 µM, ZnSO₄ 76.5 nM, H₃BO₃ 460 µM, CuSO₄ 32 nM y H₂MoO₄ 38.8 nM) y Phytigel al 0.8% para determinar los niveles de Ca²⁺ intracelular y las oscilaciones de calcio en respuesta a los FNs. Estas plantas permanecieron en recuperación por 6 horas bajo perfusión continua con medio Fåhræus a 0.25 ml/min para lo que se utilizó una bomba peristáltica (BIORAD-Econo Pump) hasta que emergen los pelos radicales para posteriormente microinyectarlas y tratarlas con los FNs.

Microinyección de pelos radicales

Los pelos radicales fueron microinyectados por presión con Fura-2-dextrán 70 KDa (10 µM) y Oregon Green-488 BAPTA-1 dextrán 70 KDa (20 µM) para medir el Ca²⁺ intracelular. Para la microinyección, cada colorante fue previamente centrifugado por 2 minutos a 7000 rpm para remover partículas no disueltas. Usando un tubo de plástico de diámetro muy pequeño y unido a una micropipeta se tomó un volumen muy pequeño (0.5 µl) y se colocó en la microaguja de inyección con diámetro de 100 µm elaborada a partir de capilares de cristal (Sutter Instruments) y mediante un jalador de agujas (Sutter Instruments). El espacio sobrante de la aguja se llenó con agua destilada. Posteriormente se insertó la aguja en la región subapical del pelo radical a aproximadamente 100 µm de la punta y el colorante se microinyectó. El Fura-2-dextrán fue calibrado usando el Kit #2 (Molecular Probes) del Buffer de calibración de Ca²⁺.

Incubación de los pelos radicales con FNs

Los FNs de *R. etli* cepa CE3/604 se purificaron por HPLC como se ha descrito previamente (Cárdenas et al., 1995). Estos fueron disueltos en 0.01% (p/v) de CHAPS, y se diluyeron hasta una concentración final de 10⁻⁸ M con medio Fåhræus el mismo que se utilizó para incubar las plántulas. Posteriormente, los FNs se aplicaron cuidadosamente a los pelos

radicales en crecimiento para reemplazar el medio libre de los FNs. Como control negativo se utilizó penta-N-acetilquitopentosa a una concentración de 10^{-8} M (Seikagaku América) disueltas en CHAPS bajo las mismas condiciones en que los FNs fueron usados.

Adquisición y Procesamiento de Imágenes

Todas las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD (Sensys Roper Scientific) unido a un microscopio invertido Nikon TE300 con un lente de inmersión en agua 40X/1 N.A. y operado con el software Meta Morph/Meta Fluor (Universal Imaging). Las células microinyectadas fueron excitadas utilizando una fuente de iluminación (DG-4, Sutter Instruments) la cual contiene una lámpara de Xenon de 175 Watts libre de ozono (330-700 nm) y un galvanómetro para seleccionar la longitud de onda. El Fura-2-dextrán fue excitado a una longitud de onda de 340 nm (Ca^{2+} dependiente) y 380 nm (Ca^{2+} no dependiente) con una emisión a 510 nm. Todos los filtros son de Chroma Technology y para el análisis de imagen se utilizó el software Meta Morph/Meta Fluor (Universal Imaging) el cual nos permitió obtener la relación entre la imagen con la señal dependiente de Ca^{2+} y la imagen con la señal independiente de Ca^{2+} para la cuantificación de Ca^{2+} intracelular.

Inoculación de plantas de frijol con *Rhizobium etli*

Para la determinación de la expresión de nodulinas en plantas de TS y mutante en respuesta a *R. etli*, se colectaron raíces inoculadas con la cepa CE-3. Esta cepa se cultivó en un medio con peptona de caseína (5 g/L) y extracto de levadura (3 g/L) adicionado con CaCl_2 0.07 M. Los antibióticos ácido nalidíxico 2 mg/100 ml y estreptomina 100 mg/100 ml se utilizaron para crecer y seleccionar la cepa CE-3. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación hasta una D.O. de 0.5-0.6 leído a una longitud de onda de 600 nm. Las células de este cultivo, se lavaron 2 veces con MgSO_4 , 10 mM y se resuspendieron en 50 ml de medio Fåhraeus.

Las semillas germinadas se colocaron en macetas con vermiculita previamente esterilizada y se inocularon con 0.5 ml de la suspensión de bacterias por cada planta. Se regaron periódicamente con medio Fåhraeus hasta que las plantas se colectaron para su análisis.

Expresión de Nodulinas en respuesta a *Rhizobium etli* y *G. intraradices*

Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando plantas puestas en recuperación por 24 horas en macetas con vermiculita antes de inocularlas, para evitar analizar la expresión de

genes inducidos por estrés. Para este ensayo se obtuvieron raíces a diferentes tiempos (0, 6, 24 y 72 horas y 6, 7, 8, 9 y 10 días) de las plantas mutante y de TS inoculadas con la cepa CE-3 de *R. etli* y 0 horas, 10, 17, 21, 31 y 35 días inoculadas con *G. intraradices*.

Extracción y Transferencia de RNA

Se extrajo RNA de las raíces colectadas a diferentes tiempos de las plantas mutante y de TS, como se indicó anteriormente. Las raíces se cortaron tomando la parte de la zona de emergencia y crecimiento de los pelos radicales de plántulas recién germinadas y en raíces adultas se tomó la parte superior del sistema radical descartando la mayor parte de primordios de raíces laterales (Figura 8) debido a que *ENOD40* también se expresa en primordios de raíces laterales. Estas mismas raíces se utilizaron para determinar la expresión no sólo de *ENOD40* sino también de *ENOD2* y *LB*. Con la finalidad de que el patrón de expresión de las nodulinas estudiadas fuera representativo, se tomaron de cada tiempo y cada línea por lo menos seis plantas, las cuales se mezclaron; a partir de este material se extrajo RNA total para los experimentos tipo *Northern*.

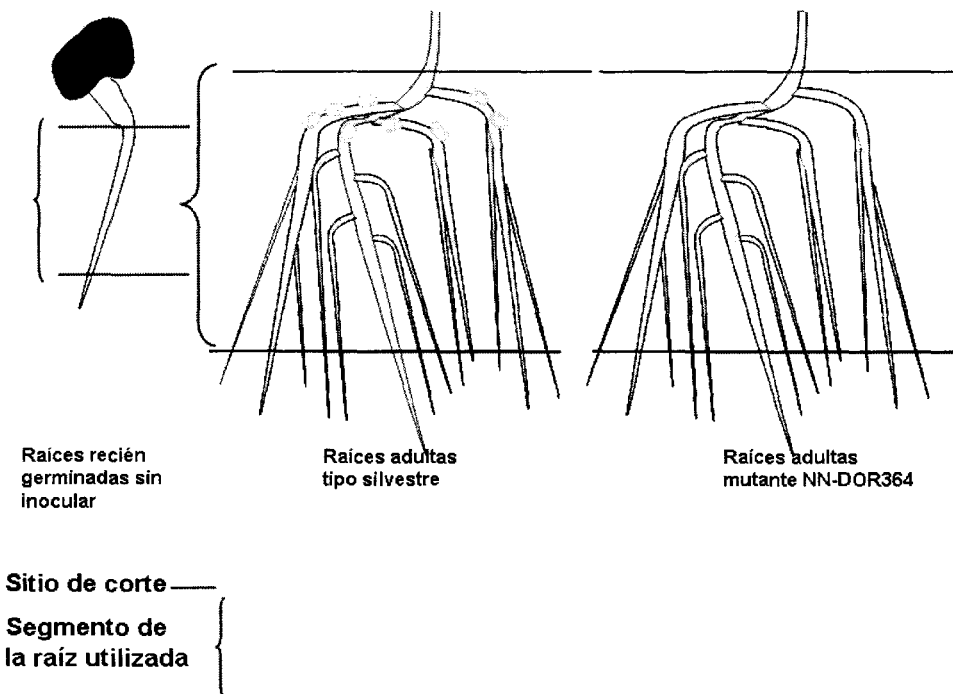


Figura 8. Representación de donde se realizaron los cortes de las raíces jóvenes y maduras para el análisis de la expresión de las nodulinas. Las líneas muestran el sitio de corte y la llave muestra el segmento de la raíz utilizada.

Las raíces colectadas se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C hasta obtener todas las muestras y así procesar todas las muestras para extraer el RNA. El método utilizado fue el descrito por Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). La concentración de RNA total se cuantificó y se cargaron 20 µg de cada muestra en geles de agarosa al 1%, formaldehído 3% y MOPS 1X (MOPS 10X pH7: MOPS 200mM, CH₃COONa·3H₂O 0.8 M y EDTA0.01 M). El buffer de electroforesis en el que se colocaron los geles para separar el RNA total, fue MOPS 1X. Las muestras de RNA total separadas, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente se lavó el gel con MOPS 1X nuevo por 10 min 2 veces. Se colocó en SSC 10X durante 10 min y a continuación se cambió a SSC 20X por 10 min. Se colocó este gel sobre 4 cuadros de papel Whatman del mismo tamaño que el gel sumergidos en SSC20X y enseguida la membrana de Nylon previamente sumergida en agua destilada por 5 min y después en SSC 10X por otros 5 min. Encima de la membrana se colocaron 2 cuadros de papel Whatman sumergidos en SSC10X y se le retiró toda burbuja que pudo haber quedado. Encima, se colocaron otros 2 cuadros del mismo papel secos y además suficiente papel absorbente y algún material pesado que oprima los papeles y facilite transferir las muestras del gel a la membrana. Después de 24 horas, se retiró todo papel de encima de la membrana y se fijó el RNA transferido a la membrana. Para fijarla, se colocó ésta en SSC 2X por 3 min, después en NaOH 0.04 N por 3 min y se lavó por último con SSC 2X por 3 min. Esta membrana se conservó en una bolsa de plástico a 4° C y en la oscuridad hasta su uso.

Preparación de Sondas

DNA de *Enod2*. Esta sonda se encuentra clonada en el vector pKS⁻ + fragmento de *ENOD2* de soya (pKSED-2). El fragmento de *ENOD2* de aproximadamente 750 pb se libera con las enzimas de restricción *Pst*I y *Hind*III (Bonilla et al., 1997).

cDNA de *Enod40*. Esta sonda se obtuvo por RTPCR a partir de RNA de raíces de frijol Negro Jamapa de 7 días post-inoculación con *R. etli* y es un fragmento de 380 pb. Para amplificar este fragmento, se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Papadopolou et al., 1996 los cuales son: PvE40-1 (CTG GTG AGC ATC AAG TTT TG) y PvE40-2 (CTA GTG AGC TGC AAA TTG AG). El fragmento obtenido se secuenció y la secuencia obtenida se comparó con la base de datos (BLAST), presentaron una identidad con *PvENOD40*.

cDNA de Leghemoglobina. Se aisló de un banco de cDNA de nódulos de frijol de 15 días. El cDNA se envió a secuenciar y se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran dicho fragmento. Los oligos utilizados son: LegU (TCA CTG AGA AGC AAG AGG CT), LegL (GCT GCT GCC AAT TCA TCG TA) que amplifican un fragmento de 480 pb, éste se utilizó como sonda para los experimentos tipo *Northern*.

Experimentos tipo *Northern*

Las sondas se marcaron con [³²P] dCTP de acuerdo al protocolo del Kit de marcaje Rediprime II Random (RPN1633) (Amersham). Para precipitar la sonda, se le agregó al tubo de reacción 300 µl de Magic Probe (DNA de esperma de salmón a 1 mg/ml, EDTA 10 mM y NaH₄AcO 2.5 M) y 200 µl de Isopropanol y se dejó reposar a -20°C durante 24 horas. Se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en NaOH 0.1 N, posteriormente se calentó la sonda a 95°C por 5 minutos y se le agregó al tubo de hibridación (NaH₂PO₄ 0.3 M y SDS 7%). Simultáneamente las membranas se prehibridaron (NaH₂PO₄ 0.3 M, SDS 7% y DNA de esperma de salmón 0.03 mg/ml) al menos 24 horas antes de la hibridación. La hibridación se realizó a 60°C por 48 horas.

Las membranas hibridadas se lavaron en solución de baja astringencia cambiándole el SSC (Cloruro de Sodio y Citrato de Sodio) 4X y SDS (Duodecil Sulfato de Sodio 0.1 %) por 15 min. a 60°C a 65°C por 15 min. y 65°C por otros 15 min. Finalmente se lavaron con SSC 2X y se colocaron en protectores de plástico para exponerlas ya sea en la pantalla del Fosfo-Imager o en casetes de exposición Marca Kodak para revelarlos.

Infeción por Micorrizas (*Glomus intraradices*)

La doctora Beatriz Xoconostle (CINVESTAV) nos donó una cepa de *Glomus intraradices*, la cual se nos proporcionó en raíces infectadas de jitomate. En estas raíces, el micelio y las esporas se desarrollan en medio M (KNO₃ 80 mg/L, MgSO₄. 7H₂O 731 mg/L, KCl 65 mg/L, KH₂PO₄ 4.8 mg/L, Ca(NO₃)₂.4H₂O 288 mg/L, MnCl₂. 4H₂O 6 mg/L, H₃BO₃ 1.5 mg/L, ZnSO₄.7H₂O 2.65 mg/L, 0.0024 mg/L, CuSO₄.5H₂O 0.13 mg/L, KI 0.75 mg/L, FeSO₄. 7H₂O 2780 mg/L, Na₂EDTA.H₂O 3730 mg/L, Glicina 3 mg/L, Myo-inositol 50 mg/L, Acido nicotínico 0.5 mg/L, Piridoxina HCl 0.1 mg/L, Tiamina HCl 0.1 mg/L, Sacarosa 10 g/L) y Phytigel al 0.4%. Para preparar este medio se colocó en un recipiente agua desionizada agregándole la sacarosa y los nutrientes minerales; se ajustó el pH a 5.5 y se agregó el Phytigel. Posteriormente se esterilizó a 110°C por 15 minutos. Cuando esta solución llegó a una temperatura de 37°C se le agregaron las vitaminas y se vertió en cajas petri de dos compartimentos para propagar el micelio y las esporas. Se colocaron trozos de la raíz de jitomate del cultivo original en un compartimiento de la caja Petri con el medio M solidificado dejando el otro libre para que en el momento en que el micelio se extienda, llegue hasta esta parte de la caja y se colecte el micelio con esporas libre de raíces. Este micelio con esporas libre de raíces se colectó para usarlo como inóculo en la infección de las plantas de frijol.

Las raíces de frijol se infectaron de la siguiente forma: se esterilizó tierra de monte mezclada con vermiculita, ambas previamente humedecidas. Esta mezcla se inoculó con trozos de medio M con Phytigel el cual contiene micelio y esporas y se cubrió con papel aluminio dejándose a una temperatura de 27°C durante 4-5 semanas. Cuando se observa el micelio crecido entre y sobre la mezcla, es que este inóculo se encuentra listo para colocar parte de él en una capa en medio de dos capas de tierra y vermiculita sin esporas ni micelio en macetas como se muestra en la figura 9.

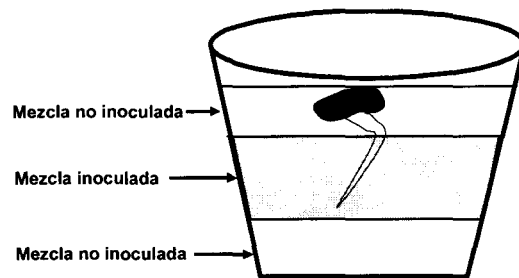


Figura 9. Dibujo que representa la forma en que se organizaron las capas de tierra en las macetas que se utilizaron para infectar con hongos AM, la capa media es la que está inoculada con el micelio y donde debe quedar inmersa la radícula de la plántula.

En estas macetas se sembraron semillas germinadas de frijol TS y en otra maceta plantas mutantes. Como se muestra en la figura 9, la radícula debe quedar en la capa inoculada para que éstas estén en contacto con el micelio y puedan ser infectadas. Las macetas se regaron con agua estéril de la llave y se mantuvieron en el invernadero durante el tiempo requerido bajo condiciones controladas de temperatura (26-28°C) y humedad (35-45% relativa).

Este procedimiento se utilizó para determinar la capacidad, frecuencia de infección y la expresión de leghemoglobina inducidas por micorrizas en las raíces de las plantas mutante y de TS.

Tinción de Raíces colonizadas por *G. intraradices*

Las raíces de las plantas de 4-5 semanas de infección se seleccionaron sin cortar la planta, estas solamente se arrancaron de la maceta y se lavaron con agua abundante para eliminar los residuos de vermiculita, y se fijaron por 24 horas con etanol al 50%. Posteriormente se lavaron y se transfirieron a KOH al 5% para clarificarlas y se autoclavearon con esta solución por 15 minutos a 120°C. Una vez esterilizadas se lavaron con agua abundante para eliminar los residuos de KOH. Por último, las raíces se tiñeron por 1 hora a 50°C con la solución

de tinción que contiene 0.1% de Negro E de Clorazol, y 85% de ácido láctico/glicerol (en agua). Las raíces se destiñeron transfiriéndolas a glicerol al 100% y se montaron en un portaobjetos colocándoles un cubreobjetos para observarlas al microscopio óptico con esta misma solución.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Análisis genético de la línea mutante NN-DOR364

Actividad biológica de los FNs en los pelos radicales de las plantas tipo silvestre y mutante NN-DOR364

Expresión de nodulinas en respuesta a la infección por *R. etli*

Expresión de una nodulina temprana, ENOD40

Expresión de ENOD2

Expresión de Leghemoglobina (LB)

Determinación de los niveles de Calcio intracelular en la línea mutante NN-DOR364

Oscilaciones de Ca^{2+} en la mutante NN-DOR364 en respuesta a los FNs

Infección por micorrizas

Expresión de Leghemoglobina en respuesta a la inoculación con *G.* intraradices

RESULTADOS

Análisis genético de la línea mutante NN-DOR364

Davis et al., (1988), mutagenizaron las semillas de frijol de la variedad RIZ30 usando 0.08 M de EMS por 4 horas. Una de las mutantes obtenidas, Nod⁻ (incapaz de nodular), fue llamada NOD125, (Pedalino et al., 1992) y los estudios genéticos muestran herencia monogénica recesiva, a este alelo le nombraron *sym-1* (Pedalino et al., 1992). La mutante NOD125 se cruzó con la variedad DOR364 (CIAT, Cali, Colombia), obteniéndose la mutante NN-DOR364 en la que se realizó un análisis genético para corroborar los resultados obtenidos en la mutante NOD125 por Pedalino et al., 1992.

Para llevar a cabo el análisis genético de la mutante NN-DOR364, se cruzaron las plantas en ambas direcciones, esto es, la cruce TS(estigma)XMUT(poleno) y la cruce MUT(estigma)XTS(poleno). De estas cruces, se obtuvieron 28 semillas de la cruce TSXMUT y 67 semillas de la cruce MUTXTS que corresponden a la generación F1, se sembró la mitad de ellas. Al sembrarlas, se inocularon con la cepa CE-3 de *R. etli* y se regaron con medio libre de Nitrógeno con el fin de observar el fenotipo de interés (las plantas mutantes son cloróticas cuando se crecen en ausencia de nitrógeno debido a su incapacidad de nodular). El fenotipo de la generación F1 se determinó escarbando la raíz de las plantas y observando la presencia o ausencia de nódulos. El 100% de las plantas obtenidas de las cruces tanto en la dirección TSXMUT como MUTXTS resultaron en un fenotipo Nod⁺ (presencia de nódulos). Adicionalmente, se observó el fenotipo de la planta completa. Las plantas al nodular y en ausencia de Nitrógeno, presentan un color foliar verde intenso, mientras que, en las plantas no nodulantes y libres de nitrógeno, se observa un color foliar alterado (amarillo). Con este enfoque pudimos distinguir una planta nodulante de una no nodulante, por el fenotipo de la parte aérea de la planta. Las plantas de la generación F1 presentaron el fenotipo silvestre, lo cual nos permite proponer que la mutación es recesiva.

Las plantas de la generación F1 se autopolinizaron para obtener semillas de la generación F2 (recordar que la F1 proviene de la cruce tanto en la dirección TSXMUT como MUTXTS), las cuales nos permitieron obtener 389 semillas de la F2 provenientes de la cruce (MUTXTS) y 121 semillas de la cruce (TSXMUT). Posteriormente se sembraron 125 semillas de la cruce MUTXTS y 40 de la cruce TSXMUT. Los resultados y las proporciones obtenidas de la generación F2 fueron los siguientes: de un total de 125 semillas sembradas provenientes de la cruce MUTXTS lograron desarrollarse 122 de las cuales 95 nodularon y 27 no nodularon (proporción 3:1) y de la cruce TSXMUT de 40 semillas sembradas, 36 nodularon y 4 no

nodularon (proporción 9:1). Los resultados resumidos y las proporciones obtenidas se muestran en la Tabla 4.

Los resultados de las retrocruzas fueron los siguientes: de la cruce MUTXF1 se obtuvieron 11 plantas no-nodulantes y 17 nodulantes. De la cruce TSXF1 se obtuvieron 6 plantas de las cuales todas mostraron un fenotipo nodulante.

Es importante mencionar que al realizar las primeras cruces se hizo en las dos direcciones, es decir, TSXMUT, donde a la planta TS se eliminó el polen y a su estigma se le colocó el polen de la mutante; y MUTXTS, donde a la planta mutante se le eliminó el polen y a su estigma se colocó el polen de la planta TS. Al obtener las semillas de estas cruces por separado, todas ellas resultaron con un fenotipo nodulante, sin embargo, si en la dirección TSXMUT a la planta TS no se removiera todo el polen, y se hubiese autopolinizado, no podríamos distinguir en el resultado de la F1 si se debe a la cruce o a una autopolinización, probablemente a esto se deba una proporción de 9:1 en la dirección TSXMUT o al bajo número de semillas probadas. En el caso de la dirección MUTXTS las semillas de las plantas mutantes si hubiera una autopolinización por no remover el polen totalmente, hubiésemos obtenido plantas mutantes que se descartarían. Sin embargo, en las cruces de prueba (retrocruza) hemos podido confirmar las proporciones esperadas.

Tabla 4

Generación	F1		F2				Cruza de Prueba		
	No. Plantas		No. plantas		Análisis X^2		No. plantas		
Cruza	<i>nod</i> ⁺	<i>nod</i> ⁻	<i>nod</i> ⁺	<i>nod</i> ⁻	Esp	X^2		<i>nod</i> ⁺	<i>nod</i> ⁻
TSXMUT	28	0	36	4	3:1	4.8	TSXF1	6	0
MUTXTS	67	0	95	27	3:1	0.53	MUTXF1	17	11

Es importante recordar que el análisis genético hecho por Pedalino et al., (1992) en la mutante NOD125 resultó en una herencia monogénica recesiva, estos resultados fueron consistentes en la mutante NN-DOR364, la cual proviene de la cruce DOR364XNOD125, y nos permiten concluir que la mutante en estudio presenta herencia monogénica recesiva. Además reportaron que el carácter no-nodulante de la mutante NOD125, es específicamente expresado en la raíz y no puede ser transferido injertando el brote mutante con la raíz silvestre y a la inversa (Pedalino et al., 1992).

Actividad biológica de los FNs en los pelos radicales de las plantas TS y mutante NN-DOR364

Una de las respuestas morfológicas más tempranas causadas por los FNs en plantas leguminosas, es la deformación de los pelos radicales mostrando hinchazón, ramificación y

redirección del crecimiento de estos. Se ha demostrado que esta respuesta inicia tan temprano como una hora después de haber tratado a los pelos radicales con los FNs específicos (ver Tabla 1). Con la finalidad de determinar si los pelos radicales de la línea mutante respondían a la presencia de los FNs, tratamos a estas células con FNs de *R. etli* a una concentración de 10^{-8} M. En la Figura 10 se muestran los pelos radicales de la planta TS (a, b y d) y de la mutante (c y e) tratados con los FNs purificados de *R. etli* (b, c, d y e) y sin tratar (a), los cuales únicamente se exponen a la presencia de pentámeros de quitina 10^{-8} M como control negativo ya que se ha reportado que la estructura central de los FNs sin las modificaciones químicas específicas de cada especie de rizobio, no causa ningún efecto en los pelos radicales (Cárdenas et al., 1999 a). Como se observa, tanto los pelos de la planta TS como los de la mutante responden con deformación, lo cual nos sugiere que la línea mutante NN-DOR364 no se encuentra afectada en la percepción de los FNs.

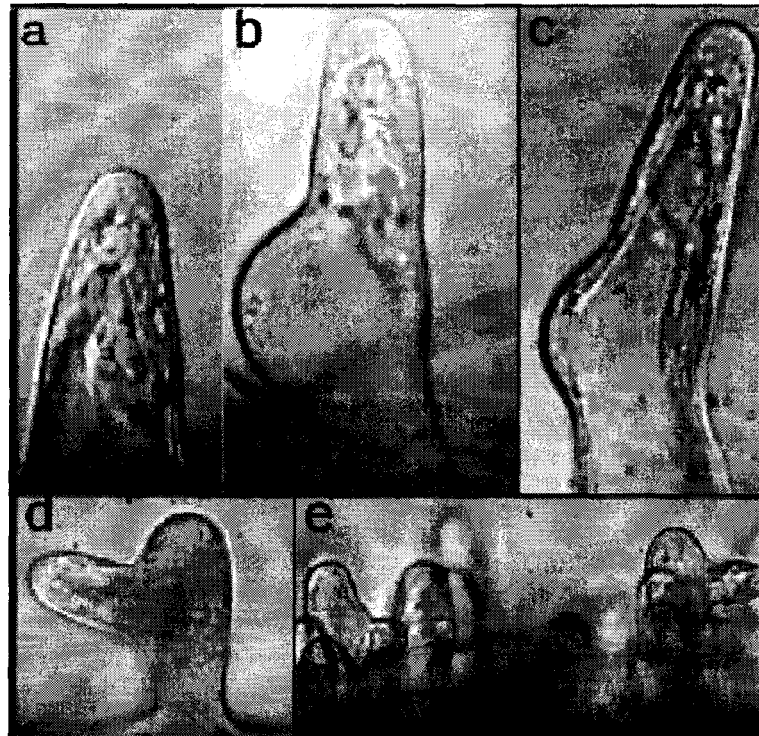


Figura 10. Pelos radicales de las plantas TS y mutante responden a la presencia de los FNs de *R. etli* después de 2-4 horas. a, pelo radical tratado con pentámeros de quitina de la planta TS como control negativo. b y d, pelos radicales de la planta TS después de 4 horas de tratamiento con FNs purificados de *R. etli*, muestran redirección del crecimiento y ramificación de los mismos, una respuesta típica a los FNs. En c y e, se muestran los pelos radicales de la planta mutante respondiendo a los FNs de forma similar a la planta TS.

Los pelos radicales que normalmente responden a la presencia de los FNs son aquellos que se encuentran en la región II, que corresponde a los que están creciendo rápidamente. Se sabe por estudios en otras leguminosas que los pelos radicales correspondientes a esta zona

son los que responden también con un aumento de Ca^{2+} intracelular y minutos después con oscilaciones de Ca^{2+} (Cárdenas et al., 1999b; Shaw and Long, 2003a; Wais et al., 2000).

Es muy probable que los cambios en las concentraciones y distribución de Ca^{2+} en la región apical tengan algún papel en la morfología de los pelos radicales. En este sentido es importante mencionar que en pelos radicales de *Arabidopsis* la fotoliberación de un ionóforo para calcio enjaulado en una zona determinada de la región subapical es capaz de redirigir el crecimiento hacia la zona de mayor contenido de Ca^{2+} (Bibikova et al., 1999).

Esto nos permite sugerir que el Ca^{2+} durante la etapa de infección, tiene un papel importante en la pérdida de polaridad, el reinicio del crecimiento en respuesta a los FNs y la formación del hilo de infección.

Expresión de nodulinas en respuesta a la infección por *R. etli*

Con la finalidad de observar en la línea mutante la expresión de algunos de los genes específicos de la nodulación como son las nodulinas tempranas y tardías, se realizaron experimentos tipo *Northern* en las plantas TS y NN-DOR364. Estos se llevaron a cabo con raíces de plantas puestas en recuperación por 24 horas en macetas con vermiculita antes de inocular para evitar analizar la expresión de los genes inducidos por estrés. Las raíces se colectaron a 0, 6, 24, 72 horas, 6, 7, 8, 9 y 10 días después de la inoculación con *R. etli* cepa CE-3. Los RNAs extraídos, fueron la mezcla de aproximadamente 6 plantas por cada tiempo, estos RNAs se procesaron de acuerdo a lo descrito en metodología para realizar los experimentos tipo *Northern*. En los experimentos tipo *Northern* se utilizaron como sondas moleculares *ENOD2*, *ENOD40* y LB.

Expresión de *ENOD40*, una nodulina temprana

El análisis de la expresión de *ENOD40* en raíces de frijol de las plantas TS y mutante se realizó a diferentes tiempos después de la inoculación con *R. etli*. Estos resultados se observan en la Figura 11, los cuales indicaron que las raíces de plantas TS expresan *ENOD40* desde tiempos muy tempranos (24 horas) y posteriormente se mantiene prácticamente estable por el resto de los tiempos estudiados. Sin embargo, en raíces de plantas NN-DOR364 se observa una ligera señal desde las 0 horas y a las 72 horas aumenta, la cual puede ser debido a la expresión de *ENOD40* en meristemas de raíces laterales más que en respuesta a la nodulación ya que la señal va disminuyendo mientras que en raíces de plantas TS se mantiene más o menos constante. Con los resultados obtenidos, se puede sugerir que el patrón de expresión de

ENOD40 en raíces de la planta mutante NN-DOR364 difiere del patrón de *ENOD40* en las raíces de plantas TS.

ENOD40 es un péptido de 10 -13 aa que está involucrado en la activación celular y no es específico de la formación del primordio del nódulo, sino que también se encuentra en primordios de raíces laterales, por lo tanto, *ENOD40* se expresa en las raíces independientemente de la simbiosis, sin embargo durante la simbiosis existe una inducción notable de ENOD40 en respuesta a rizobia (Papadopoulou et al., 1996).

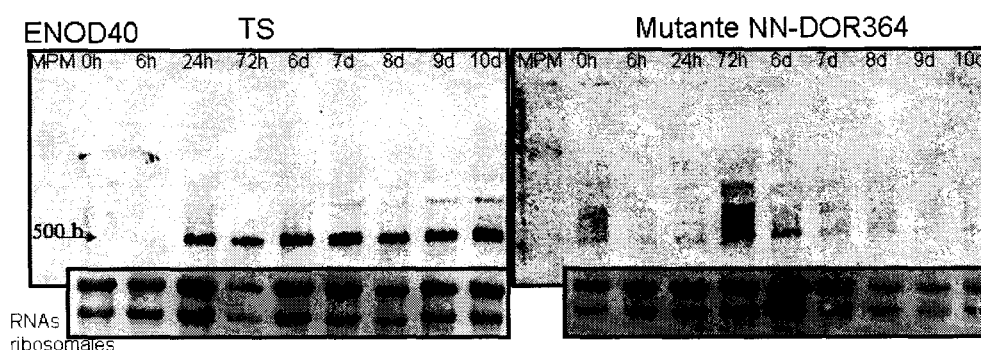


Figura 11. Expresión de *ENOD40* en raíces de plantas TS y NN-DOR364 a diferentes tiempos de inoculación con *R. etli* en experimentos tipo *Northern*. La sonda utilizada es un fragmento de *ENOD40* de aproximadamente 500 pb (para detalles ver en metodología). En esta y en todos los experimentos tipo *Northern*, los paneles de abajo muestran las bandas de los RNAs ribosomales en los geles correspondientes como control de la cantidad de RNA cargado.

ENOD40 es una de las nodulinas más estudiadas y se ha postulado que dado su marco de lectura tan pequeño, exista la posibilidad de que una región de su mRNA tenga su función en forma no traducida (Compaan et al., 2001; Crespi et al., 1994). Además, se ha sugerido que puede transportarse de un lugar a otro por medio de los haces vasculares regulando la activación de las divisiones celulares en primordios de toda la planta, ya que se ha encontrado en meristemos de órganos tanto simbióticos como no simbióticos (Flemetakis et al., 2000; Kouchi et al., 1999; Matvienko et al., 1994; Nishimura et al., 2002). *ENOD40* se expresa en respuesta a la inoculación rizobial en células del periciclo y subsecuentemente en células corticales en división. Posteriormente, en nódulos maduros la expresión es alta en el periciclo y en los haces vasculares del nódulo y en las células no infectadas. En el tejido central del nódulo presenta bajo nivel de expresión (Kouchi and Hata, 1993; Yang et al., 1993). También se ha encontrado la expresión de *ENOD40* en respuesta no sólo a la bacteria simbiótica, sino en respuesta a los FNs purificados específicos del hospedero, pentámeros de quitina (Minami et al., 1996), citocinina y durante la infección micorrizica arbuscular (Fang and Hirsch, 1998; van Rhijn et al., 1997). Además, su expresión ha sido encontrada en nódulos espontáneos y en

nódulos vacíos inducidos por algunas mutantes bacterianas (Crespi et al., 1994; Yang et al., 1993). Los resultados reportados en *M. sativa* sugieren que *ENOD40* puede estar involucrado en la iniciación de la formación del nódulo al disparar las divisiones celulares corticales (Charon et al., 1997). Los resultados vistos en la planta TS concuerdan en tiempo de expresión con los reportados en otras leguminosas donde *ENOD40* se observa desde las 24 horas (Matvienko et al., 1994).

La aplicación exógena de citocinina induce la expresión de *ENOD2* y *ENOD40* en las raíces. Además, se sabe que modulando el balance hormonas vegetales endógenas se fenocopia el efecto de los FNs (Dehio and de Bruijn, 1992; Fang and Hirsch, 1998; Hirsch et al., 1997). Por ejemplo, las divisiones celulares inducidas por los FNs pueden ser mediadas por una perturbación del flujo de auxinas (Mathesius et al., 1998). Esta idea se refuerza con las observaciones realizadas con bloqueadores del transporte polar de auxinas en la raíz, los cuales inducen la formación de estructuras tipo nódulos en alfalfa, chícharo o mutantes *sym* de trébol (Hirsch et al., 1989; Wu et al., 1996). Por lo tanto, se sugiere que el cambio en el nivel de hormonas endógenas puede originarse durante la percepción de los FNs (Hirsch and Fang, 1994).

Las citocininas inducen divisiones celulares corticales y expresión de *ENOD12* de forma similar a los FNs y esto sugiere que las citocininas y los FNs pueden compartir elementos de sus vías de transducción de señales en las células corticales para la activación de la división celular (Schultze and Kondorosi, 1998).

Durante el proceso de nodulación, la regulación del nivel hormonal es esencial y es un componente indispensable en las vías de señalización que podrían activar directa o indirectamente la transcripción de algunos de los genes llamados nodulinas.

Expresión de *ENOD2*

En la Figura 12, se muestra la expresión de *ENOD2* en raíces de plantas TS y mutante NN-DOR364 mediante un *Northern* utilizando como sonda *ENOD2* de soya. Los resultados muestran dos bandas de distinto peso molecular (una aproximadamente de 1000 bases. y otra de 1500 bases) (ver flecha correspondiente). En la planta TS se observa la banda de 1500 que se aparece a partir de las 24 horas después de la inoculación con una señal muy tenue la cual va aumentando y alcanza su pico de expresión a los 10 días. En la planta mutante, aunque se puede observar una expresión basal de *ENOD2*, no existe un aumento en la expresión como resultado de la inoculación. Estos experimentos se han repetido con resultados similares y son muy consistentes en relación a la expresión abundante de *ENOD2* en la planta TS a los 10 días post-inoculación (Figura 12, planta TS).

Es interesante mencionar que, tanto en la planta TS como en la mutante, existe la expresión de un gen que hibrida con la sonda de ENOD2 de soya de aproximadamente 1000 bases que tiene desde las cero horas una expresión basal y ésta no aumenta, sino que disminuye conforme aumentan los días de inoculación (Figura 12, plantas TS y mutante). Estos resultados son interesantes, ya que se encuentra una expresión que se induce y otra basal que disminuye en respuesta a la simbiosis. Es probable que en frijol se encuentren dos genes de *ENOD2* al igual que en soya (Franssen et al., 1990). Se ha reportado en frijol un solo transcrito de *ENOD2* con un tamaño aproximado de 1.47 Kb, y expresión desde los 8 días post-inoculación con un pico de expresión a los 12 días (Padilla et al., 1991). En frijol, el gen *ENOD2* no ha sido caracterizado y tampoco existen reportes sobre su regulación, por lo tanto estos resultados son interesantes y es importante obtener más información acerca de este gen.

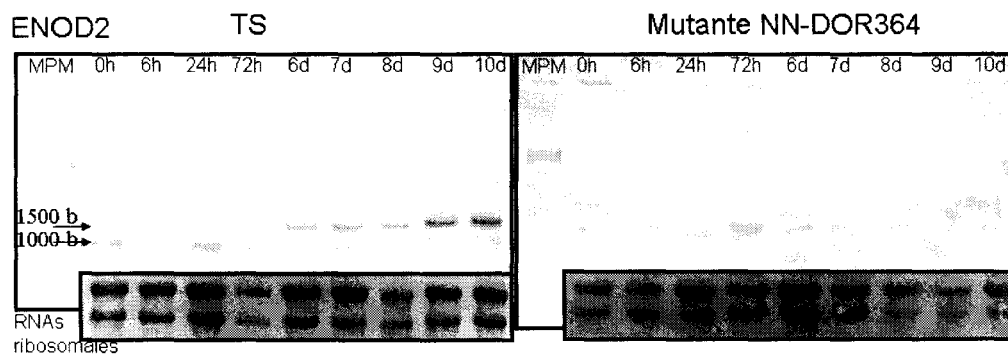


Figura 12. Experimento tipo *Northern* realizado con RNA de raíces de las plantas TS y mutante a diferentes tiempos de exposición con la bacteria *R. etli*. El RNA se hibridó contra una sonda de *ENOD2* de soya.

En otras leguminosas la expresión de *ENOD2* se ha caracterizado y la iniciación de su expresión es desde los 7-10 días post-inoculación (Gludemans and Bisseling, 1989; Govers et al., 1990; Govers et al., 1991). Nuestros resultados muestran que la expresión de *ENOD2* se induce a las 24 horas después de la inoculación en la planta TS, sin embargo, en la línea mutante no encontramos inducción de la expresión de *ENOD2*, lo cual correlaciona con el hecho de que las células corticales no entran en división celular para la formación del primordio del nódulo. *ENOD2* tiene un papel importante en la organogénesis del nódulo (van de Wiel et al., 1990) y sabemos que las divisiones celulares inician desde las 24 horas después de la inoculación (ver Figura 12, TS). Dado que es una proteína de pared celular (Dehio and de Bruijn, 1992; van de Wiel et al., 1990), es factible que se exprese a tiempos más tempranos que los reportados y que tenga su función en las paredes de las células en división para la formación del nódulo. *ENOD2* también se ha encontrado que se expresa en células del parénquima que

rodean el nódulo, el cual se postula que funciona como una barrera para el oxígeno (van de Wiel et al., 1990; Wycoff et al., 1998). En el tejido central no se expresa *ENOD2* y es por eso que se cree que debe funcionar como una proteína de pared celular que protege la parte central del nódulo donde se lleva a cabo la fijación de Nitrógeno por los bacteroides a bajas concentraciones de oxígeno (van de Wiel et al., 1990; Wycoff et al., 1998). Como ya se mencionó antes, también se ha reportado que la expresión de *ENOD2* se induce por aplicación exógena de la hormona vegetal citocinina la cual tiene la capacidad de inducir estructuras tipo nódulos cuando se le aplica exógenamente a las raíces (Dehio and de Bruijn, 1992; Hirsch et al., 1997).

Expresión de Leghemoglobina (LB)

En nuestro laboratorio contamos con un banco de cDNA de nódulos de frijol de 15 días de edad, del cual aislamos una clona correspondiente al cDNA completo de leghemoglobina (LB) de aproximadamente 450 bases. Este cDNA se utilizó como sonda para nuestros experimentos tipo *Northern* y así determinar si en la línea mutante NN-DOR364 se induce esta nodulina tardía.

En la Figura 13 se muestra un experimento tipo *Northern*, en el cual se observa que en la planta TS, la inducción de la expresión de LB se observa partir de los 6 días y aumenta conforme pasa el tiempo de inoculación. En contraste, en la planta mutante no se observa acumulación de mRNA de LB. Este resultado correlaciona con el hecho de que la línea mutante no es capaz de formar nódulos. Previamente Padilla et al., (1991), reportaron la expresión de LB a tiempos más tardíos en plantas de frijol. La variación en el tiempo de expresión podría ser por por la variedad de frijol utilizado.

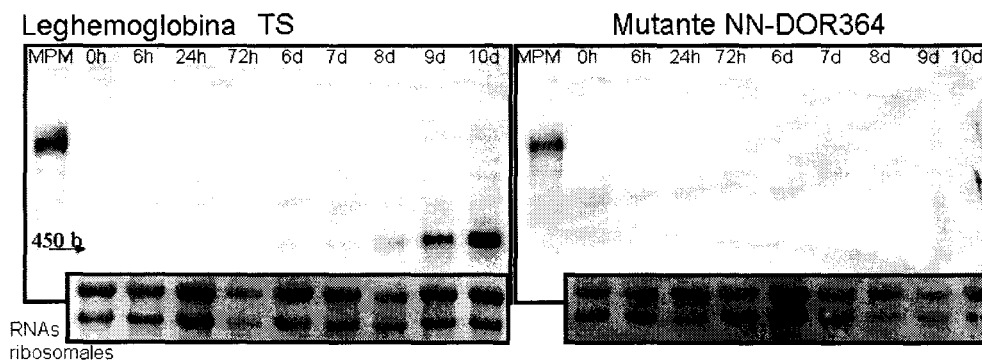


Figura 13. Análisis de expresión tipo *Northern* de RNA de raíces de frijol de las plantas TS y mutante a diferentes tiempos después de la inoculación con la cepa CE-3 de *R. etli*. El RNA extraído de las plantas TS y mutante se hibridó contra una sonda de Pv Leghemoglobina.

La LB se ha reportado como una nodulina tardía y su función se encuentra en el nódulo. Esta proteína contiene grupos *hemo* los cuales tienen la capacidad de unirse al oxígeno. Debido a que la fijación de nitrógeno en el nódulo se lleva a cabo en condiciones bajas de oxígeno, la LB es un componente esencial en el nódulo para controlar las concentraciones de oxígeno y de esta manera permitir que la reducción de nitrógeno atmosférico se lleve a cabo eficientemente. La LB es un marcador excelente para caracterizar mutantes aun en sus eventos tempranos ya que esta nodulina aunque se requiere en el nódulo, su expresión se reporta desde tiempos tan tempranos como 1, 18, 24 y 48 horas por RT-PCR (Heidstra et al., 1997; Stracke et al., 2002), sin embargo, sigue siendo considerada una nodulina tardía específica de la función del nódulo.

Determinación de los niveles de Ca^{2+} intracelular en la planta mutante NN-DOR364

Los FNs aislados y purificados de *R. etli* inducen un aumento del Ca^{2+} intracelular en pelos radicales de *P. vulgaris* (Cárdenas et al., 1999a). Esto ocurre en los primeros 5 minutos por lo que puede considerarse como una de las respuestas más tempranas después de la percepción de los FNs. Esta es una respuesta general de los pelos radicales a los FNs específicos, ya que en todas las leguminosas estudiadas a la fecha se observa este aumento. Para determinar si las plantas TS y mutante presentan un aumento de Ca^{2+} , en respuesta a los FNs, se microinyectaron pelos radicales de plántulas de frijol mutante con el colorante fluorescente Fura-2-dextrán. El Fura-2-dextrán se une a Ca^{2+} de manera específica, haciendo posible detectar los flujos de este ion (ver materiales y métodos). En la Figura 14A se muestra la imagen de un pelo radical de la planta mutante, microinyectado con Fura-2-dextrán en donde se observa el gradiente de Ca^{2+} característico de los pelos radicales en crecimiento. Este pelo radical fue tratado con pentámeros de *N*-acetilglucosamina como control negativo ya que se sabe, que no causa ningún efecto en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Cárdenas et al., 1999a). Interesantemente, el ápice del pelo presenta las concentraciones de Ca^{2+} más altas, medidas (800 nM) en comparación con el resto de la célula que muestra concentraciones de alrededor de 250 nM. En la Figura 14B, se muestra el mismo pelo radical 5 minutos después de la aplicación de los FNs purificados de *R. etli*, en el que se observa claramente un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en el ápice el cual alcanza niveles de 1500 a 1800 nM.

Cárdenas et al., (1999), demostraron que los pelos radicales de frijol responden con un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular a los FNs de *R. etli*. Estos incrementos de Ca^{2+} son una respuesta general ya que también se observan en pelos radicales de otras leguminosas (Ehrhardt et al., 1996; Shaw and Long, 2003a; Walker et al., 2000) En vista de que es una de las respuestas más tempranas estudiadas, en el proceso de nodulación la acumulación de Ca^{2+} se utiliza como herramienta para caracterizar mutantes en eventos

tempranos. Por ejemplo, los pelos radicales de las mutantes, *nfr1* y *nfr5* de *L. japonicus*, no responden con un aumento en la concentración de Ca^{2+} a la presencia de los FNs (Radutoiu et al., 2003), Por lo tanto los autores proponen que las proteínas codificadas por estos genes son candidatos fuertes para los receptores exclusivos de los FNs.

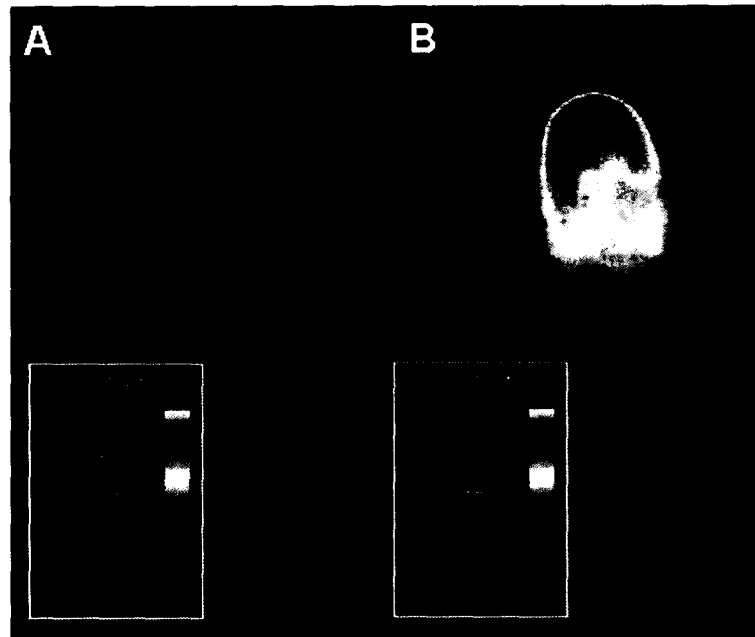


Figura 14. Pelos radicales de la planta mutante NN-DOR364 microinyectados con fura-2-dextrán (70 KDa) y tratados con pentámeros de quitina (10^{-8} M) o FNs (10^{-8}). A; Pelo radical tratado con pentámeros de quitina como control negativo mostrando un típico gradiente de Ca^{2+} . B; Mismo pelo radical después de 5 minutos del tratamiento con los FNs. Nótese el claro incremento en los valores de Ca^{2+} intracelular, con valores de 800 nM en la célula control hasta 1500-1800 nM en presencia de los FNs. La tabla de concentración está expresada en concentraciones nanomolares.

Nuestros datos sugieren que en la planta NN-DOR364 la mutación afectó algún paso río abajo del probable receptor específico de los FNs ya que sus pelos radicales son capaces de responder a los FNs con aumento de la concentración de Ca^{2+} (Figura 14), a diferencia de las mutantes ya descritas en los receptores específicos de los FNs que no responden con un aumento de Ca^{2+} intracelular.

Oscilaciones de calcio en la mutante NN-DOR364 en respuesta a los FNs

En la vía de señalización que se activa como respuesta a la percepción de los FNs en los pelos radicales de leguminosas, se reporta un aumento y una disminución de la concentración de calcio en respuesta a los FNs conocido como oscilaciones de calcio (Cárdenas et al., 1999a; Ehrhardt et al., 1996; Harris et al., 2003). Las oscilaciones de calcio inducidas por los FNs ocurren aproximadamente 10 minutos después del tratamiento con los

FNs o rizobia y generalmente están restringidas a la región nuclear (Cárdenas et al., 1999a; Ehrhardt et al., 1996; Walker et al., 2000). Estas oscilaciones inician con un aumento rápido de la concentración de calcio seguido de una disminución gradual, lo cual sugiere la participación de canales de calcio que permiten retomar el calcio liberado y almacenarlo nuevamente en algunos de los reservorios internos (Ehrhardt et al., 1996). Estudios farmacológicos apoyan la hipótesis de que los canales de calcio intervienen en las oscilaciones de este ión (Engstrom et al., 2002), y también se ha demostrado que dichas oscilaciones son esenciales para desencadenar la transcripción de genes específicos involucrados en el proceso de la nodulación en leguminosas llamados nodulinas (Oldroyd et al., 2001b; Shaw and Long, 2003b).

Con la finalidad de determinar si la mutante NN-DOR364 se encuentra afectada en las oscilaciones de calcio, evento posterior a los influjos de Ca^{2+} apical, se microinyectaron pelos radicales de las plantas TS (Figura 15a) y mutante (Figura 15b) con Oregon Green-488 BAPTA-1 dextrán. En la Figura 15a se muestra en la primera imagen, un pelo radical de la planta silvestre tratado con pentámeros de quitina como control, en donde se observa el gradiente de Ca^{2+} apical esperado para una célula en crecimiento (Hepler et al., 2001). En la Figura 15a, también observamos el aumento de calcio intracelular en el ápice del pelo radical, 3 minutos después del tratamiento con los FNs purificados de *R. etli* (segunda imagen). Después de 10 minutos de tratamiento (ver flecha grande), inician las oscilaciones de calcio, que ocurren básicamente en la región nuclear (señalado por las flechas pequeñas).

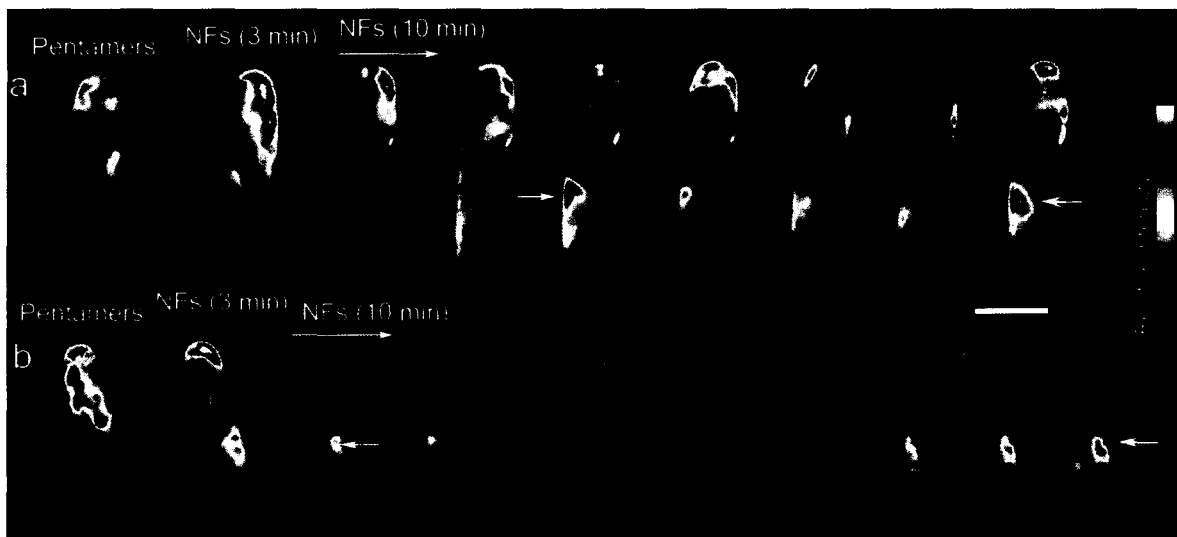


Figura 15. Pelo radical de las plantas TS y mutante NN-DOR364 microinyectados con Oregon Green-488 BAPTA-1 dextrán para visualizar los cambios en Ca^{2+} intracelular después de tratarlos con FNs. **a**, un pelo radical de la planta TS tratado con pentámeros de quitina (control negativo, primera imagen). En la segunda imagen, el mismo pelo radical que responde con un incremento en los niveles de Ca^{2+} en la región apical después de 3 min de ser tratados con los FNs de *R. etli*. Después de 10 min (flecha grande) de tratamiento con los FNs se observan oscilaciones de Ca^{2+} en la región nuclear (ver flechas pequeñas). La barra colorimétrica indica la intensidad relativa. **b**, los pelos radicales de la planta mutante NN-DOR364 también responden después de 3 minutos de tratamiento con los FNs con un aumento de Ca^{2+} en la zona apical del pelo y después de 10 minutos (flecha grande) se observan las oscilaciones de Ca^{2+} (ver flechas pequeñas).

En la Figura 15b se muestra la secuencia de imágenes de un pelo radical de la planta mutante tratado con pentámeros de quitina como control (10^{-8}M) (primera imagen) y después de 3 minutos de tratamiento con los FNs (10^{-8}M), en donde nuevamente se muestra el aumento de Ca^{2+} intracelular en el ápice del pelo (segunda imagen) y después de 10 minutos las oscilaciones de Ca^{2+} en la región nuclear (ver flechas pequeñas). Estos resultados nos permiten concluir que los pelos radicales de la planta mutante NN-DOR364 responden con las oscilaciones de calcio en respuesta a los FNs.

Existen diferentes mutantes en la nodulación afectados río arriba de las oscilaciones de Ca^{2+} , dos de ellas son las mutantes de *L. japonicus* afectadas en los genes *CASTOR* y *POLLUX*, que cuando son inoculadas con su simbionte, sus pelos radicales se hinchan y ramifican, sin formar hilos de infección ni tener oscilaciones de Ca^{2+} (Imaizumi-Anraku et al., 2005). La caracterización de estos genes muestra que las proteínas *CASTOR* Y *POLLUX* tienen alta identidad con canales de potasio que son activados por cambios en la concentración de Ca^{2+} , además presentan un péptido señal de transporte a plástidos, los cuales en respuesta a los FNs migran a la región del núcleo, por lo que es probable que estas proteínas transmembranales se encuentren involucradas en las oscilaciones de Ca^{2+} (Imaizumi-Anraku et al., 2005). El ortólogo de *CASTOR* y *POLLUX* de *M. truncatula* es el gen *DMI1* (Ane et al., 2004). Interesantemente, las tres mutantes mencionadas son incapaces de formar asociaciones micorrízicas, lo cual nos permite sugerir que las oscilaciones de Ca^{2+} son esenciales tanto para la simbiosis micorrízica como bacteriana.

La mutante NN-DOR364 es capaz de inducir las oscilaciones de Ca^{2+} en respuesta a los FNs, lo cual nos permite proponer que no se encuentra afectado en ninguno de los genes antes descritos (*NFR1*, *NFR5*, *CASTOR* y *POLLUX*). Interesantemente las mutantes en los receptores tipo cinasa con dominios LRR, SYMRK y NORK de *L. japonicus* y *M. truncatula*, respectivamente, se encuentran afectadas en la nodulación y en la micorrización, sin embargo, siguen respondiendo con deformación de los pelos radicales pero no presentan oscilaciones de calcio, ni formación del hilo de infección. Esto ha permitido sugerir la posibilidad de un mecanismo de percepción común necesario para las dos interacciones (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Los reportes mencionados nos sugieren que tanto las proteínas transmembranales con alta identidad con canales catiónicos como los receptores tipo cinasa con dominios ricos en LRR son esenciales y probablemente forman vías compartidas para que se lleve a cabo un adecuado proceso de micorrización y de nodulación.

Como lo muestran nuestros resultados en la mutante NN-DOR364, las tres nodulinas estudiadas no presentan el mismo patrón de expresión observado en la planta TS, lo cual nos

permite sugerir que probablemente esté afectada en uno de los genes posteriores a la inducción de las oscilaciones de Ca^{2+} como *NSP1* y *NSP2*, sin embargo, mutantes en estos genes tienen la capacidad de formar micorrizas aun cuando son *Nod⁻*, por lo que es indispensable analizar este fenotipo.

Infeción por micorrizas

Debido que la planta mutante NN-DOR364 se encuentra afectada en los eventos tempranos del proceso simbiótico, también fue de nuestro interés investigar si la mutante se encuentra afectada en su capacidad para formar asociaciones micorrízicas. Para esto, se trataron las plantas TS y mutante con el hongo micorrízico *Glomus intraradices*. En la Figura 16 se muestran raíces de las plantas TS y mutante colectadas 5 semanas después de la inoculación con *G. intraradices* y teñidas con Negro E de Clorazol. Interesantemente, las micorrizas se forman tanto en la planta TS como en la mutante. En la Figura 16 A, B y C se observan raíces de la planta TS en la cual se detectan estructuras características de una infección eficiente por micorrizas. Las apresorias, la primera estructura formada por las hifas fungales se observa claramente en la Figura 16A (Ap), posteriormente le sigue la penetración y la ramificación de las hifas de manera intercelular (Figura 16B) y finalmente la internalización en las células corticales de estas hifas para la formación de las estructuras llamadas arbuscúlos (Ar), las cuales indican que se está llevando a cabo el intercambio mutuo de nutrientes. En la Figura 16A se observan con detalle los arbuscúlos formados dentro de la célula vegetal y la ramificación de las hifas intraradicalmente (Hi). Las estructuras que se conocen como vesículas arbusculares (Va), tienen la capacidad de almacenar los nutrientes y se muestran en la Figura 16C. En las Figuras 16D, E y F se muestran las raíces de la planta mutante donde podemos observar estructuras similares a las observadas en las raíces TS. En la Figura 16E se observan las apresorias y la ramificación de las hifas internas mientras que la formación de arbuscúlos se muestra en la Figura 16D. En la Figura 16F se muestra claramente la formación de vesículas arbusculares y la ramificación de las hifas internas y externas (Hi y He).

A las mutaciones en plantas que afectan la infección por micorrizas se les clasifica en dos tipos principales. Una es la mutación denominada *Myc⁻¹* en la que solamente se forman las apresorias de forma abultada y la otra esta ejemplificada por la mutación *Myc⁻²* en la cual existe penetración y ramificación interna y externa de las hifas, pero los arbuscúlos no llegan a formarse (Gianinazzi-Pearson, 1996; Harrison, 1997). En las raíces de la planta mutante NN-DOR364, se forman todas las estructuras características de una colonización de plantas TS por micorrizas en sus raíces, por lo que se puede concluir que la mutante NN-DOR364 es incapaz

de nodular pero sí mantiene la capacidad de ser infectada por hongos micorrízicos arbusculares.

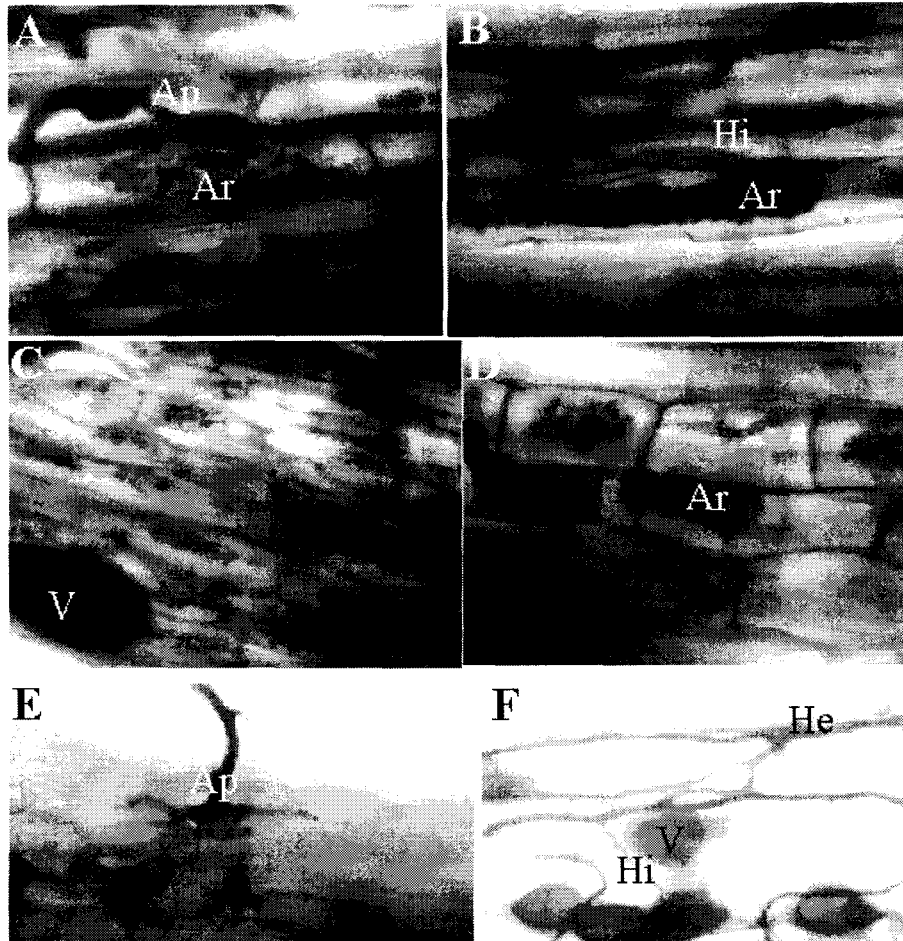


Figura 16. Raíces de frijol de las plantas TS (A, B y C) y mutante (D, E y F) inoculadas con *G. intraradices* para determinar la capacidad de formar asociaciones micorrízicas. Las raíces fueron colectadas a las 5 semanas de inoculación y teñidas con Negro E de clorazol. (Ap) aporesorias, (Ar) Arbúsculos, (V) Vesículas arbusculares, (He) Hifas externas e (Hi) Hifas internas. Las figuras A – E fueron observadas al microscopio con un lente 60X de inmersión en aceite y la figura F fue observada con un lente 40X de inmersión en agua.

Con la finalidad de obtener datos que nos permitieran comparar la capacidad de infección por hongos micorrízicos entre las plantas de TS y mutante, se cuantificó el número de arbusculos por área mediante el protocolo descrito por Giovannetti, et al., (1980), en raíces de 52 días de inoculación con *G. intraradices*. Esto se expresó como porcentaje de la raíz colonizada por arbusculos. Se analizaron cortes de raíz de un centímetro, en grupos de 10 y los resultados obtenidos fueron muy similares. La gráfica de la Figura 17, muestra un promedio de tres experimentos en donde la desviación estándar nos indica que no hay diferencia significativa en el porcentaje de las raíces colonizadas por arbusculos entre las plantas TS y mutante.

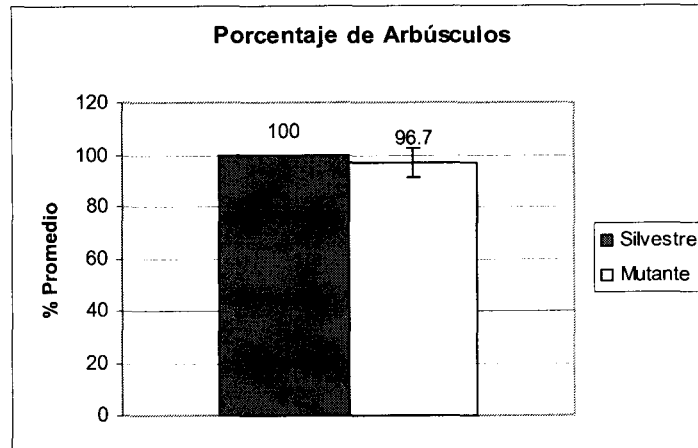


Figura 17. La gráfica muestra de manera cuantitativa la capacidad de formación de arbusculos de las plantas de TS y mutante. Los resultados se muestran como un promedio del porcentaje de arbusculos encontrados en tres series de conteos.

Estos resultados nos permiten sugerir que la planta mutante probablemente no se encuentre afectada en el receptor de los FNs y los elicitores fúngicos (*NFR1*, *NFR5*, *NORK*, *SYMRK*). Esto explica en parte porqué la planta mutante aun mantiene la capacidad de responder con deformación de los pelos radicales y cambio en Ca^{2+} intracelular en respuesta a los FNs, debido a que probablemente ninguno de los genes involucrados en la percepción inicial se encuentra alterado.

También fue de nuestro interés estudiar las plantas resultantes de la generación F2 que se obtuvieron en la caracterización genética, estas son las plantas homocigotas para el gen mutante. Después de comprobar el fenotipo de no-nodulación, se inocularon con *G. intraradices* y así comprobamos que efectivamente mantienen la capacidad de ser micorrizadas, sugiriendo que la mutación afectó únicamente la capacidad de nodulación y no la de formar micorrizas. Esto sugiere además, que la mutación muy probablemente no se localiza en alguno de los genes que se han descrito como comunes para la micorrización y para la nodulación que se ubican al principio de la cascada de señalización, sino que en alguno de los eventos posteriores, probablemente después de *DMI3* ya que la mutante *dmi3* es incapaz de ser micorrizada.

Expresión de LB en respuesta a la inoculación con *G. intraradices*

Se ha reportado la expresión de algunas nodulinas como ENOD2, ENOD40 (van Rhijn et al., 1997), leghemoglobina (Fruhling et al., 1997), ENOD12 (Gianinazzi-Pearson, 1996), y ENOD11 (Journet et al., 2001) en respuesta a micorrizas arbusculares. Estos datos permiten sugerir que la vía de transducción de señales podría conservarse para ambas interacciones (bacteriana y micorrízica). Dado que la planta mutante NN-DOR364 tiene la capacidad de ser

micorrizada y al parecer con una frecuencia similar a la TS, decidimos determinar el nivel de expresión de LB en la planta mutante en respuesta a la inoculación con el hongo *G. intraradices* por medio de hibridaciones tipo *Northern*. Para estos experimentos, se utilizaron raíces de TS y mutante colectadas a diferentes tiempos: 0h, 10, 17, 21, 31 y 35 días después de la inoculación con *G. intraradices*. También se utilizó RNA de 10 días después de la inoculación con *R. etli*, como control.

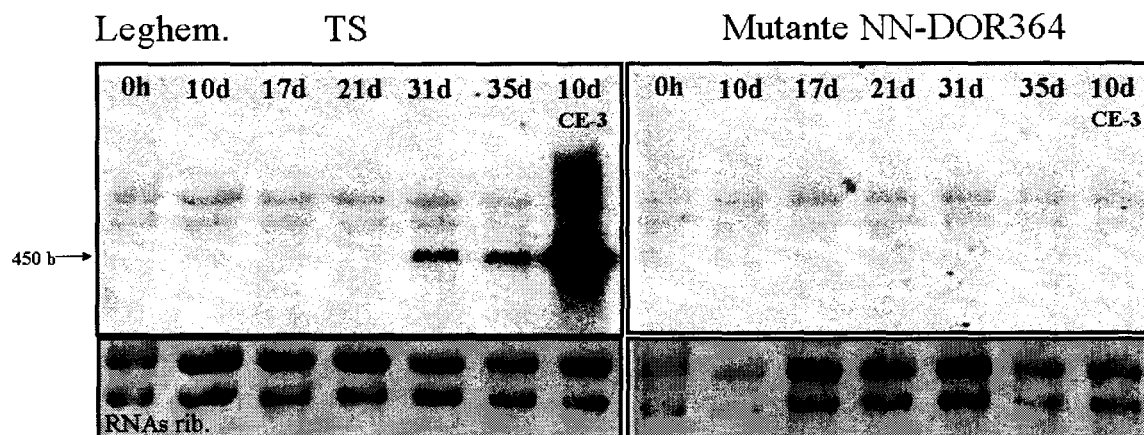


Figura 18. Análisis de expresión tipo *Northern* de RNA de raíces de frijol de las plantas TS y mutante a diferentes tiempos después de la inoculación con *G. intraradices*. La sonda de LB utilizada se aisló de un banco de cDNAs de nódulos de frijol de 15 días.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18, en los que se observa expresión de leghemoglobina a los 31 y 35 días de micorrización en raíces de TS, aunque el nivel de expresión es menor al observado en raíces inoculadas con la bacteria. Es interesante que en la planta mutante no se observa señal significativa. Por lo tanto podemos sugerir que la LB es inducible en las raíces de TS en respuesta a micorrizas y los niveles de inducción son menores a los obtenidos cuando se inocula con *R. etli*, mientras que la mutante aun cuando tiene la capacidad de micorrizar no induce la expresión de LB.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado la expresión de Leghemoglobina en respuesta a la micorrización (Fruhling et al., 1997). Lo que será interesante, es ahora saber qué función realiza la leghemoglobina en la interacción micorrízica. El hecho de que una mutante como la NN-DOR364 que no tiene la capacidad de nodular pero sí de ser infectada por micorrizas y que la leghemoglobina no se exprese bajo condiciones de micorrización en esta mutante, nos provee información sobre el nivel de importancia de la leghemoglobina en la interacción micorrízica, y aunque se ha reportado su expresión (como se observa en las raíces de TS), ésta, parecería no ser necesaria para la interacción micorrízica. Esto es interesante, ya que aunque la expresión de algunas nodulinas que son comunes en las dos interacciones,

pueden no ser necesarias para la colonización micorrízica. Esta mutante NN-DOR364 sería una excelente herramienta para explorar esta hipótesis.

CAPÍTULO V

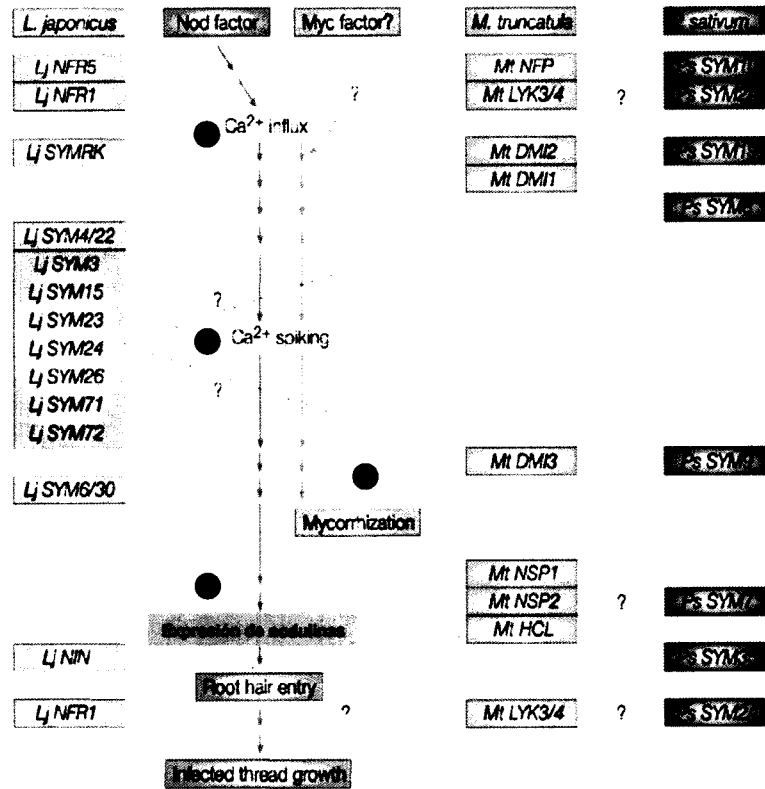
DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan en este trabajo se realizaron en una línea mutante Nod⁻ (NN-DOR364) de *Phaseolus vulgaris* variedad Dorado Centroamericano. Los resultados obtenidos de la caracterización genética de esta mutante sugieren que la mutación es recesiva y que un solo gen está afectado ya que en la generación F2 hay una segregación de 3:1 (Nod⁺, Nod⁻). Por lo tanto la mutación en ese gen aun desconocido, es el responsable del fenotipo deficiente en la nodulación (ver tabla 4). En este trabajo se encontró que los pelos radicales de la línea mutante, responden a la presencia de los FNs de *R. etli* con cambios morfológicos como deformación e hinchamiento, y un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Igualmente, abordamos el análisis de la expresión de las nodulinas tempranas como ENOD2 y ENOD40 y la nodulina tardía leghemoglobina tanto en las plantas TS como mutante NN-DOR364 para conocer si la mutante estaba afectada en la expresión de estos genes. En la planta TS existe la expresión de un transcrito de *ENOD2* de aproximadamente 1.5 Kb que se induce claramente desde las 24 horas después de la inoculación. Nuestras observaciones concuerdan con las reportadas en otras plantas no solo en la expresión de ENOD2 sino también con los tiempos en que se da la morfogénesis del nódulo (Dickstein et al., 1988; Govers et al., 1990). En la planta mutante se observa un nivel basal del transcrito de ENOD2 que disminuye después de la inoculación. En la planta TS se induce la expresión de *ENOD40* desde las 24h manteniéndose prácticamente estable a lo largo de la cinética. En contraste, en las raíces de la planta mutante aunque se observa una ligera señal desde las 0h y aumenta sus niveles del mRNA de ENOD40 a las 72h después de la inoculación, el patrón de expresión en esta cinética difiere de la expresión de ENOD40 en las raíces de la planta TS. Por otro lado, la expresión de LB en la planta TS se acumula claramente desde los 6 días después de la inoculación, la cual aumenta en los días posteriores, mientras que en la línea mutante no se observó acumulación de LB. La ausencia de LB en la mutante NN-DOR364 podría ser una consecuencia de las deficiencias en la activación de genes para el desarrollo del nódulo en la mutante. Otra alternativa es que aunque la LB es una nodulina tardía, se observa a tiempos tempranos lo que sugiere que al igual que ENOD2 y ENOD40 se requiere para formar meristemas de nódulos.

Los estudios de infección por micorrizas en las plantas TS y mutante utilizando *G. intraradices*, mostraron que la mutante mantiene la capacidad de ser infectada. Esto se comprueba al observar las estructuras fungales características colonizando la raíz de la planta, como son arbuscúlos y vesículas arbusculares que son las que determinan que el proceso de infección sea completo. Además, la mutante presenta el mismo nivel de infección que la planta TS.

Finalmente en la Figura 19 se muestra un modelo de los eventos de respuesta descritos hasta ahora y de cómo pudieran estar actuando los diferentes genes en la interacción rizobio-leguminosa.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 19. Modelo actual que describe la ruta de señalización en respuesta a los FN. Dentro de este modelo se han ubicado todas las mutaciones descritas hasta ahora y se hace referencia a los sitios de señalización compartidos entre la asociación micorrízica y la modulación. Los círculos verdes indican los fenotipos observados en la mutante NN-DOR364 y los círculos rojos los que no se observan. Tomado de Oldroyd and Downie, (2004).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Perspectivas

CONCLUSIONES

- El análisis genético hecho en la mutante NN-DOR364, presenta herencia monogénica recesiva.

- Los pelos radicales de la mutante NN-DOR364, además de responder con cambios morfológicos a la presencia de los FNs, también presentan un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en respuesta a los FNs de *R. etli*.

- Los pelos radicales de la mutante NN-DOR364 presentan oscilaciones de calcio a los tiempos establecidos en respuesta a los FNs.

- Los transcritos de *ENOD2* y *ENOD40*, nodulinas tempranas, en la planta mutante NN-DOR364 presentan un patrón de expresión diferente al de la planta TS en respuesta a la inoculación con *R. etli*.

- La expresión de la nodulina tardía Leghemoglobina no se induce en la planta mutante de frijol NN-DOR364 en respuesta a *R. etli* ni en respuesta a *G. intraradices*.

- Los estudios de infección por micorrizas en las plantas TS y mutante utilizando *G. intraradices*, mostraron que la mutante mantiene la capacidad de ser infectada y en una frecuencia similar a la planta TS.

- Estos resultados en su conjunto nos sugieren que esta línea mutante no se encuentra afectada en ninguno de los dos receptores tipo cinasa descritos, SYMRK y NORK, los cuales se propone que juegan un papel en la percepción de los FNs y de los elicitores micorrízicos (Stracke et al., 2002) ya que esta línea mutante mantiene la capacidad de ser micorrizada. Por otro lado, también se puede concluir que no se encuentra afectada en los receptores específicos de los FNs en los ortólogos de *NFR1*, *NFR5* (Radutoiu et al., 2003), debido a que la mutante responde con los eventos más tempranos, como son el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en el ápice del pelo y la deformación de los pelos radicales. También podemos concluir que la mutante NN-DOR364 se encuentra afectada río abajo de la percepción de los FNs y elicitores micorrízicos, probablemente en algún paso de la cascada de señalización que impida continuar con el proceso de nodulación como son la expresión de nodulinas, la formación del hilo de infección y la activación de la división celular para la formación del primordio del nódulo. Esto, está apoyado en el hecho de que la mutante NN-DOR364 aun mantiene la capacidad de inducir las oscilaciones de Ca^{2+} , sin embargo no es capaz de inducir la expresión de nodulinas. Unas de las mutantes afectadas después de las oscilaciones de Ca^{2+} es *Dmi3*, sin embargo, mutantes en este gen son incapaces de formar micorrizas por lo que es poco probable de que se trate de una mutación en este gen.

De las mutantes descritas hasta ahora, las que tienen un fenotipo similar a la mutante de frijol NN-DOR364, son las mutantes en *NSP1* o en *NSP2* de *M. truncatula*. Estos genes codifican

para proteínas que pertenecen a la familia GRAS de reguladores transcripcionales que parecen activar la expresión de genes de nodulación (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005); estas proteínas son esenciales para la cascada de señalización que lleva a la nodulación pero no son necesarias para la micorrización y actúan río abajo de las oscilaciones de Ca^{2+} y de la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CCaMK). NSP2 se localiza en la envoltura nuclear y en menor nivel en el retículo endoplásmico, se ha sugerido que estas dos proteínas pudieran actuar de manera cooperativa (Smit et al., 2005). Debido a la similitud de los fenotipos es probable que la mutante NN-DOR364 se encuentre afectada en alguno de estos genes, lo cual se está explorando actualmente en el laboratorio.

Perspectivas

En el modelo de la Figura 19, resulta evidente ubicar en dónde pudiera localizarse la mutación de DOR364, sin embargo aun se tiene que explorar en detalle la hipótesis arriba propuesta y será necesario primeramente aislar y secuenciar los ortólogos de *NSP1* y *NSP2* y ver si hay alguna mutación puntual la cual pudiera ser responsable del fenotipo. Si esto no nos proporciona ninguna información al respecto habrá que buscar nuevos enfoques que nos permitan aislar la mutación, como la búsqueda de transcritos de baja expresión, método introducido por Mitra et al., 2004, el cual se ha probado de manera exitosa en *M. truncatula* para aislar genes mutados de interés durante la nodulación.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Able, A.J. 2003. Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protospasma*. 221:137-143.
- Alemán, E. 2002. Caracterización morfológica y molecular de una línea mutante de *Phaseolus vulgaris* (frijol) en las respuestas tempranas del proceso de simbiosis. In Instituto de Biotecnología/UNAM. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos. 57.
- Allison, L.A., G.B. Kiss, P. Bauer, M. Poiret, M. Pierre, A. Savoure, E. Kondorosi, and A. Kondorosi. 1993. Identification of two alfalfa early nodulin genes with homology to members of the pea Enod12 gene family. *Plant Mol Biol*. 21:375-80.
- Amon, P., E. Haas, and M. Sumper. 1998. The sex-inducing pheromone and wounding trigger the same set of genes in the multicellular green alga *Volvox*. *Plant Cell*. 10:781-9.
- Amor, B.B., S.L. Shaw, G.E. Oldroyd, F. Maillet, R.V. Penmetsa, D. Cook, S.R. Long, J. Denarie, and C. Gough. 2003. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J*. 34:495-506.
- Ane, J.M., G.B. Kiss, B.K. Riely, R.V. Penmetsa, G.E. Oldroyd, C. Ajax, J. Levy, F. Debelle, J.M. Baek, P. Kalo, C. Rosenberg, B.A. Roe, S.R. Long, J. Denarie, and D.R. Cook. 2004. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science*. 303:1364-7.
- Ardourel, M., N. Demont, F. Debelle, F. Maillet, F. de Billy, J.C. Prome, J. Denarie, and G. Truchet. 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell*. 6:1357-74.
- Balestrini, R., G. Berta, and P. Bonfante. 1992. The plant nucleus in mycorrhizal roots: Positional and structural modifications. *Biol. Cell*. 75:235-243.
- Bécard, G., L. Taylor, D. Douds, R. Pfeffer, and L. Doner. 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *MPMI*. 8:252-258.
- Benaben, V., G. Duc, V. Lefebvre, and T. Huguet. 1995. TE7, An Inefficient Symbiotic Mutant of *Medicago truncatula* Gaertn. cv Jemalong. *Plant Physiol*. 107:53-62.
- Berta, G., S. Sgorbati, V. Soler, A. Fusconi, A. Trotta, A. Citterio, M.G. Bottone, E. Sparvoli, and S. Scannerini. 1990. Variations in chromatin structure in host nuclei of vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytol*. 114:199-205.
- Bibikova, T.N., E.B. Blancaflor, and S. Gilroy. 1999. Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 17:657-65.
- Bonfante, P., R. Bergero, X. Uribe, C. Romera, J. Rigau, and P. Puigdomenech. 1996. Transcriptional activation of a maize α -tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants. *Plant Journal*. 9:737-743.
- Bonfante, P., A. Genre, A. Faccio, I. Martini, L. Schauser, J. Stougaard, J. Webb, and M. Parniske. 2000. The *Lotus japonicus* LjSym4 gene is required for the successful symbiotic infection of root epidermal cells. *Mol Plant Microbe Interact*. 13:1109-20.
- Bonilla, I., C. Mergold-Villasenor, M.E. Campos, N. Sanchez, H. Perez, L. Lopez, L. Castrejon, F. Sanchez, and G.I. Cassab. 1997. The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyproline-/proline-rich proteins. *Plant Physiol*. 115:1329-40.
- Borisov, A.Y., L.H. Madsen, V.E. Tsyganov, Y. Umehara, V.A. Voroshilova, A.O. Batagov, N. Sandal, A. Mortensen, L. Schauser, N. Ellis, I.A. Tikhonovich, and J.

- Stougaard. 2003. The Sym35 gene required for root nodule development in pea is an ortholog of Nin from *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 131:1009-17.
- Cárdenas, L., J. Domínguez, C. Quinto, I.M. Lopez-Lara, B.J. Lugtenberg, H.P. Spaik, G.J. Rademaker, J. Haverkamp, and J.E. Thomas-Oates. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol.* 29:453-64.
- Cárdenas, L., J.A. Feijo, J.G. Kunkel, F. Sánchez, T. Holdaway-Clarke, P.K. Hepler, and C. Quinto. 1999a. *Rhizobium* nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant J.* 19:347-52.
- Cárdenas, L., J.A. Feijó, J.G. Kunkel, F. Sánchez, T. Holdaway-Clarke, P.K. Hepler, and C. Quinto. 1999b. *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant J.* 19:347-52.
- Cárdenas, L., L. Vidali, J. Domínguez, H. Pérez, F. Sánchez, P.K. Hepler, and C. Quinto. 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* 116:871-7.
- Catoira, R., C. Galera, F. de Billy, R.V. Penmetsa, E.P. Journet, F. Maillet, C. Rosenberg, D. Cook, C. Gough, and J. Denarie. 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell.* 12:1647-66.
- Charon, C., C. Johansson, E. Kondorosi, A. Kondorosi, and M. Crespi. 1997. *enod40* induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:8901-8906.
- Charon, C., C. Sousa, M. Crespi, and A. Kondorosi. 1999. Alteration of *enod40* expression modifies *medicago truncatula* root nodule development induced by *sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell.* 11:1953-66.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.
- Collinge, D.B., P.L. Gregersen, and H. Thordal-Chrintensen. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In *mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity: Modern Approaches and Perspectives*. Marcel Dekker, New York. 391-433 pp.
- Compaan, B., W. Yang, T. Bisseling, and H. Franssen. 2001. ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*-legume interaction and the highly conserved internal of the gene does not encode a peptide. *Plant and Soil.* 230:1-8.
- Cook, D., D. Dreyer, D. Bonnet, M. Howell, E. Nony, and K. VandenBosch. 1995. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell.* 7:43-55.
- Crespi, M.D., E. Jurkevitch, M. Poiret, Y. d'Aubenton-Carafa, G. Petrovics, E. Kondorosi, and A. Kondorosi. 1994. *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *Embo J.* 13:5099-112.
- Davis, J., K. Giller, J. Kipe-Nolt, and M. Awah. 1988. Non-nodulating mutants in common bean. *Crop Science.* 28:859-860.
- Dehio, C., and F.J. de Bruijn. 1992. The early nodulin gene *SrEnod2* from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin. *Plant J.* 2:117-28.
- Dickstein, R., T. Bisseling, V.N. Reinhold, and F.M. Ausubel. 1988. Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. *Genes Dev.* 2:677-87.

- Duc, G., A. Trouvelot, V. Gianinazzi-Pearson, and S. Gianinazzi. 1989. First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc-) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Science*. 60:215-222.
- Ehrhardt, D.W., E.M. Atkinson, and S.R. Long. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*. 256:998-1000.
- Ehrhardt, D.W., R. Wais, and S.R. Long. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*. 85:673-81.
- Endre, G., A. Kereszt, Z. Kevei, S. Mihacea, P. Kalo, and G.B. Kiss. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*. 417:962-6.
- Engstrom, E.M., D.W. Ehrhardt, R.M. Mitra, and S.R. Long. 2002. Pharmacological analysis of nod factor-induced calcium spiking in *Medicago truncatula*. Evidence for the requirement of type IIA calcium pumps and phosphoinositide signaling. *Plant Physiol*. 128:1390-401.
- Fang, Y., and A.M. Hirsch. 1998. Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol*. 116:53-68.
- Felle, H., E. Kondorosi, A. Kondorosi, and M. Shultze. 1996. Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to *Rhizobial* lipochitooligosaccharide signals. *Plant Journal*. 10:295-301.
- Felle, H., E. Kondorosi, A. Kondorosi, and M. Shultze. 1998. The role of ion fluxes in Nod Factor signaling in *Medicago sativa*. *Plant Journal*. 13:455-463.
- Flemetakis, E., N. Kavroulakis, N.E. Quaedvlieg, H.P. Spaink, M. Dimou, A. Roussis, and P. Katinakis. 2000. *Lotus japonicus* contains two distinct ENOD40 genes that are expressed in symbiotic, nonsymbiotic, and embryonic tissues. *Mol Plant Microbe Interact*. 13:987-94.
- Foreman, J., V. Demidchik, J.H. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M.A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J.D. Jones, J.M. Davies, and L. Dolan. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422:442-6.
- Franken, C., and F. Gnadinger. 1994. Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: Infection development and mRNA levels of defense related genes. *MPMI*. 7:612-620.
- Franssen, H.J., D.V. Thompson, K. Idler, R. Kormelink, A. van Kammen, and T. Bisseling. 1990. Nucleotide sequence of two soybean ENOD2 early nodulin genes encoding Ngm-75. *Plant Mol Biol*. 14:103-6.
- Fruhling, M., H. Roussel, V. Gianinazzi-Pearson, A. Puhler, and A.M. Perlick. 1997. The *Vicia faba* leghemoglobin gene Vflb29 is induced in root nodules and in roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. *Mol Plant Microbe Interact*. 10:124-31.
- Gage, D.J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68:280-300.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *Plant Cell*. 8:1871-1883.
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. 84:489-500.
- Gloudemans, T., and T. Bisseling. 1989. Plant Gene Expression in early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant science*. 65:1-4.
- Govers, F., H. Franssen, C. Pieterse, J. Wilmer, and T. Bisseling. 1990. Functions and regulation of early nodulin gene ENOD2, London: Butterworths. 259-269 pp.

- Govers, F., H. Harmsen, R. Heidstra, P. Michielsen, M. Prins, A. van Kammen, and T. Bisseling. 1991. Characterization of the pea ENOD12B gene and expression analyses of the two ENOD12 genes in nodule, stem and flower tissue. *Mol Gen Genet.* 228:160-6.
- Harris, J.M., R. Wais, and S.R. Long. 2003. Rhizobium-Induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:335-41.
- Harrison, M.J. 1997. The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: an underground association. *Trends in Plant Science.* 2:54-60.
- Harrison, M.J. 2005. Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annu Rev Microbiol.*
- Harrison, M.J., and R.A. Dixon. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *MPMI.* 6:643-654.
- Heidstra, R., R. Geurts, H. Franssen, H.P. Spaink, A. Van Kammen, and T. Bisseling. 1994. Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* 105:787-797.
- Heidstra, R., G. Nilsen, F. Martinez-Abarca, A. van Kammen, and T. Bisseling. 1997. Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH₄NO₃ inhibition on root hair deformation. *Mol Plant Microbe Interact.* 10:215-20.
- Heldt, H. 1996. Plant Biochemistry and Molecular Biology. *Oxford EUA*:278-279.
- Hepler, P.K., L. Vidali, and A.Y. Cheung. 2001. Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:159-87.
- Hirsch, A.M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist.* 122:211-237.
- Hirsch, A.M., T.V. Bhuvaneshwari, J.G. Torrey, and T. Bisseling. 1989. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *PNAS.* 86:1244-1248.
- Hirsch, A.M., and Y. Fang. 1994. Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Mol Biol.* 26:5-9.
- Hirsch, A.M., Y. Fang, S. Asad, and Y. Kapulnik. 1997. The role of phytohormones in plant-microbe symbiosis. *Plant Soil.* 194:171-184.
- Hirsch, A.M., M.R. Lum, and J.A. Downie. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127:1484-92.
- Ibijbijen, J., S. Urquiaga, M. Ismaili, B. Alves, and R. Boddey. 1996. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytol.* 134:353-360.
- Imaizumi-Anraku, H., N. Takeda, M. Charpentier, J. Perry, H. Miwa, Y. Umehara, H. Kouchi, Y. Murakami, L. Mulder, K. Vickers, J. Pike, J.A. Downie, T. Wang, S. Sato, E. Asamizu, S. Tabata, M. Yoshikawa, Y. Murooka, G.J. Wu, M. Kawaguchi, S. Kawasaki, M. Parniske, and M. Hayashi. 2005. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature.* 433:527-31.
- Jones, M.A., J.J. Shen, Y. Fu, H. Li, Z. Yang, and C.S. Grierson. 2002. The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell.* 14:763-76.
- Journet, E.P., N. El-Gachtouli, V. Vernoud, F. de Billy, M. Pichon, A. Dedieu, C. Arnould, D. Morandi, D.G. Barker, and V. Gianinazzi-Pearson. 2001. *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:737-48.

- Journet, E.P., M. Pichon, A. Dedieu, F. de Billy, G. Truchet, and D.G. Barker. 1994. Rhizobium meliloti Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* 6:241-9.
- Kalo, P., C. Gleason, A. Edwards, J. Marsh, R.M. Mitra, S. Hirsch, J. Jakab, S. Sims, S.R. Long, J. Rogers, G.B. Kiss, J.A. Downie, and G.E. Oldroyd. 2005. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science.* 308:1786-9.
- Kosuge, T., and E. Nester. 1989. Plant Microbe Interactions Molecular and Genetic Perspectives. *Mc Graw Hill EUA*:384.
- Kosuta, S., M. Chabaud, G. Loughon, C. Gough, J. Denarie, D.G. Barker, and G. Becard. 2003. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131:952-62.
- Kouchi, H., and S. Hata. 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol Gen Genet.* 238:106-19.
- Kouchi, H., K. Takane, R.B. So, J.K. Ladha, and P.M. Reddy. 1999. Rice ENOD40: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant J.* 18:121-9.
- Limpens, E., C. Franken, P. Smit, J. Willemsse, T. Bisseling, and R. Geurts. 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science.* 302:630-3.
- Lindsey, K., S. Casson, and P. Chilley. 2002. Peptides: new signalling molecules in plants. *Trends Plant Sci.* 7:78-83.
- Lloyd, C., K. Pearce, D. Rawlins, R. Ridge, and P. Shaw. 1987. Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration. *Cell Motil. Cytosk.* 8:27-36.
- Lum, H.K., Y.K. Butt, and S.C. Lo. 2002a. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Nitric Oxide.* 6:205-13.
- Lum, M., Y. Li, T. LaRue, R. David-Schwartz, Y. Kapulnik, and A. Hirsch. 2002b. Investigation of Four Classes of Non-nodulating White Sweetclover (*Melilotus alba annua* Desr.) Mutants and Their Responses to Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Integ. and Comp. Biol.* 42:295-303.
- Madsen, E.B., L.H. Madsen, S. Radutoiu, M. Olbryt, M. Rakwalska, K. Szczyglowski, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal, and J. Stougaard. 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature.* 425:637-40.
- Marsh, J., and Schultze, M. 2001. Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytologist.* 150:525-532.
- Mathesius, U., H.R. Schlaman, H.P. Spaink, C. Of Sautter, B.G. Rolfe, and M.A. Djordjevic. 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14:23-34.
- Matvienko, M., K. Van de Sande, W.C. Yang, A. van Kammen, T. Bisseling, and H. Franssen. 1994. Comparison of soybean and pea ENOD40 cDNA clones representing genes expressed during both early and late stages of nodule development. *Plant Mol Biol.* 26:487-93.
- Mellor, R.B. 1989. Bacteroids in the Rhizobium-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: Implications for other microbial endosymbioses. *Journal of Exp. Bot.* 40:831-839.

- Miklashevics, E., H. Rohrig, J. Shell, and J. Schmidt. 2001. Perception and Signal Transduction of Rhizobial Nod Factors. *Critical Rev. in Plant Science*. 20:373-394.
- Miller, D.D., N. de Ruijter, T. Bisseling, and A. Emons. 1999. The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal*. 17:141-154.
- Minami, E., H. Kouchi, J.R. Cohn, T. Ogawa, and G. Stacey. 1996. Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *Plant J*. 10:23-32.
- Mitra, R.M., C.A. Gleason, A. Edwards, J. Hadfield, J.A. Downie, G.E. Oldroyd, and S.R. Long. 2004. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:4701-5.
- Murphy, P., and S. Smith. 1996. Cloning Plant genes diferentially expressed during colonisation of *Hordeum vulgare* (L.) roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* in press.
- Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* 7:869-885.
- Nishimura, R., M. Hayashi, G.J. Wu, H. Kouchi, H. Imaizumi-Anraku, Y. Murakami, S. Kawasaki, S. Akao, M. Ohmori, M. Nagasawa, K. Harada, and M. Kawaguchi. 2002. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*. 420:426-9.
- Oldroyd, G.E., and J.A. Downie. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:566-76.
- Oldroyd, G.E., E.M. Engstrom, and S.R. Long. 2001a. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 13:1835-49.
- Oldroyd, G.E., R.M. Mitra, R.J. Wais, and S.R. Long. 2001b. Evidence for structurally specific negative feedback in the Nod factor signal transduction pathway. *Plant J*. 28:191-9.
- Padilla, J., J. Miranda, and F. Sánchez. 1991. Nodulin Regulation in Common Bean Nodules Induced by Bacterial Mutants. *MPMI*. 4:433-439.
- Papadopoulou, K., A. Roussis, and P. Katinakis. 1996. Phaseolus ENOD40 is involved in symbiotic and non-symbiotic organogenetic processes: expression during nodule and lateral root development. *Plant Mol Biol*. 30:403-17.
- Park, S., and B. Buttery. 1992. Ethyl-methane sulphonate (EMS) induced nodulation mutants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lacking effective nodules. *Plant and Soil*. 139:295-298.
- Pedalino, M., K. Giller, and J. Kipe-Nolt. 1992. Genetic and Physiological Characterization of the Non-nodulating mutant of *Phaseolus vulgaris* L.-NOD125. *Journal of Exp. Bot.* 43:843-849.
- Pedalino, M., J. Kipe-Nolt, L. Frusciante, and L. Monti. 1993. Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Mutants Defective in Root Nodule Formation. *Journal of Exp. Bot.* 44:1015-1020.
- Penmetsa, R.V., and D.R. Cook. 2000. Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*. 123:1387-98.
- Perotto, S., N. Brewin, and L. Kannenberg. 1994. Cytological evidence for a host-defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *MPMI*. 7:99-112.
- Phillips, D., and S. Tsai. 1992. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes. *Mycorrhiza*. 1:55-58.

- Pierre, J., T. Bisseling, and W. Stiekema. 2000. Biology of Plant microbe Interactions. *MPMI*. 2:45-49.
- Pingret, J.L., E.P. Journet, and D.G. Barker. 1998. Rhizobium nod factor signaling. Evidence for a g protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell*. 10:659-72.
- Radutoiu, S., L.H. Madsen, E.B. Madsen, H.H. Felle, Y. Umehara, M. Gronlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal, and J. Stougaard. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*. 425:585-92.
- Ramu, S.K., H.M. Peng, and D.R. Cook. 2002. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact*. 15:522-8.
- Raven, P., R. Evert, and S. Eichhorn. 1992. Biology of Plants. *Worth Publishers New York*:604-605.
- Ryder, T.B., S.A. Hedrick, J.N. Bell, X.W. Liang, S.D. Clouse, and C.J. Lamb. 1987. Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Gen Genet*. 210:219-33.
- Scheres, B., C. Van De Wiel, A. Zalensky, B. Horvath, H. Spaink, H. Van Eck, F. Zwartkruis, A.M. Wolters, T. Gloudemans, A. Van Kammen, and et al. 1990. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-Rhizobium interaction. *Cell*. 60:281-94.
- Schultze, M., and A. Kondorosi. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet*. 32:33-57.
- Schultze, M., E. Kondorosi, P. Ratet, M. Buiré, and A. Kondorosi. 1994. Cell and molecular Biology of Rhizobium-Plant infections. *Int. Rev. Citol*. 156:1-75.
- Senoo, K., M.Z. Solaiman, M. Kawaguchi, H. Imaizumi-Anraku, S. Akao, A. Tanaka, and H. Obata. 2000. Isolation of two different phenotypes of mycorrhizal mutants in the model legume plant *Lotus japonicus* after EMS-treatment. *Plant Cell Physiol*. 41:726-32.
- Sgorbati, S., G. Berta, A. Trotta, L. Schellenbaum, S. Citterio, M. Dela Pierre, V. Gianinazzi-Pearson, and S. Scannerini. 1993. Chromatin structure variation in successful and unsuccessful mycorrhizas of pea. *Protoplasma*. 175:1-8.
- Shachar-Hill, Y., P.E. Pfeffer, D. Douds, S.F. Osman, L.W. Doner, and R.G. Ratcliffe. 1995. Partitioning of Intermediary Carbon Metabolism in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Leek. *Plant Physiol*. 108:7-15.
- Shaw, S.L., and S.R. Long. 2003a. Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol*. 131:976-84.
- Shaw, S.L., and S.R. Long. 2003b. Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol*. 132:2196-204.
- Shirliffe, S., and K. Vessey. 1996. A nodulation (Nod+/Fix-) mutant of *Phaseolus vulgaris* L. has nodule-like structures lacking peripheral vascular bundles (PvB-) and is resistant to mycorrhizal infection (Myc-). *Plant Science*. 118:209-220.
- Sieberer, T., and A. Emons. 2000. Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *M. truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma*. 214:118-127.
- Skoog, F., and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol*. 54:118-30.
- Smit, P., J. Raedts, V. Portyanko, F. Debelle, C. Gough, T. Bisseling, and R. Geurts. 2005. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*. 308:1789-91.

- Smith, C.J. 1996. Accumulation of phytoalexins: Defense mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* 132:1-45.
- Staelin, C., C. Charon, T. Boller, M. Crespi, and A. Kondorosi. 2001. *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulin gene *enod40* exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:15366-71.
- Stracke, S., C. Kistner, S. Yoshida, L. Mulder, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal, J. Stougaard, K. Szczyglowski, and M. Parniske. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature.* 417:959-62.
- Strittmatter, G., G. Gheysen, V. Gianinazzi-Pearson, K. Hahn, A. Niebel, W. Rohde, and E. Tacke. 1996. Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gst1* gene. *Mol Plant Microbe Interact.* 9:68-73.
- Szczyglowski, K., R. Shaw, J. Wopereis, S. Copeland, D. Hamburger, B. Kasiborski, F. Bazzo, and F. de Bruijn. 1998. Nodule organogenesis and Symbiotic mutants of the Model Legume *Lotus japonicus*. *MPMI.* 11:684-697.
- Takayama, S., and Y. Sakagami. 2002. Peptide signalling in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 5:382-7.
- Timmers, A.C., M.C. Auriac, and G. Truchet. 1999. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development.* 126:3617-28.
- Udvardi, M., Scheible, W., 2005. GRAS Genes and the Symbiotic Green Revolution. *Science* 308:1749-1750.
- Utrup, L.J., A.J. Cary, and J.H. Norris. 1993. Five Nodulation Mutants of White Sweetclover (*Melilotus alba* Desr.) Exhibit Distinct Phenotypes Blocked at Root Hair Curling, Infection Thread Development, and Nodule Organogenesis. *Plant Physiol.* 103:925-932.
- van Brussel, A., R. Bakhuizen, P. van Spronsen, H. Spaik, T. Tak, B. Lugtenberg, and J. Kijne. 1992. Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science.* 257:70-71.
- van de Sande, K., K. Pawlowski, I. Czaja, U. Wieneke, J. Schell, J. Schmidt, R. Walden, M. Matvienko, J. Wellink, A. van Kammen, H. Franssen, and T. Bisseling. 1996. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by *ENOD40* of legumes and a nonlegume. *Science.* 273:370-3.
- van de Wiel, C., B. Scheres, H. Franssen, M.J. van Lierop, A. van Lammeren, A. van Kammen, and T. Bisseling. 1990. The early nodulin transcript *ENOD2* is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *Embo J.* 9:1-7.
- van Rhijn, P., Y. Fang, S. Galili, O. Shaul, N. Atzmon, S. Wininger, Y. Eshed, M. Lum, Y. Li, V.V. To, N. Fujishige, Y. Kapulnik, and A.M. Hirsch. 1997. Expression of early nodulin genes in alfalfa mycorrhizae indicates that signal transduction pathways used in forming arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium*-induced nodules may be conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5467-5472.
- van Spronsen, P.C., M. Gronlund, C. Pacios Bras, H.P. Spaik, and J.W. Kijne. 2001. Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Mol Plant Microbe Interact.* 14:839-47.
- Vasse, J., F. de Billy, and G. Truchet. 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant Journal.* 4:555-566.

- Vijn, I., W.C. Yang, N. Pallisgard, E. Ostergaard Jensen, A. van Kammen, and T. Bisseling. 1995. VsENOD5, VsENOD12 and VsENOD40 expression during Rhizobium-induced nodule formation on *Vicia sativa* roots. *Plant Mol Biol.* 28:1111-9.
- Volpin, H., Y. Elkind, Y. Okon, and Y. Kapulnik. 1994. A Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungus (*Glomus intraradix*) Induces a Defense Response in Alfalfa Roots. *Plant Physiol.* 104:683-689.
- Wais, R.J., C. Galera, G. Oldroyd, R. Catoira, R.V. Penmetsa, D. Cook, C. Gough, J. Denarie, and S.R. Long. 2000. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13407-12.
- Walker, S.A., V. Viprey, and J.A. Downie. 2000. Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13413-8.
- Wegel, E., L. Schauser, N. Sandal, J. Stougaard, and M. Parniske. 1998. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. *MPMI.* 11:933-936.
- Werner, T., V. Motyka, M. Strnad, and T. Schmulling. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10487-92.
- Witty, J., F. Minchin, L. Skot, and J. Sheehy. 1986. Nitrogen Fixation and oxygen in Legume nodules. *Plant Mol Cell Biol.* 3:275-314.
- Wopereis, J., E. Pajuelo, F.B. Dazzo, Q. Jiang, P.M. Gresshoff, F.J. De Bruijn, J. Stougaard, and K. Szczyglowski. 2000. Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J.* 23:97-114.
- Wu, C., R. Dickstein, A.J. Cary, and J.H. Norris. 1996. The Auxin Transport Inhibitor N-(1-Naphthyl)phthalamic Acid Elicits Pseudonodules on Nonnodulating Mutants of White Sweetclover. *Plant Physiol.* 110:501-510.
- Wyatt, R.E., R.T. Nagao, and J.L. Key. 1992. Patterns of soybean proline-rich protein gene expression. *Plant Cell.* 4:99-110.
- Wycoff, K.L., S. Hunt, M.B. Gonzales, K.A. VandenBosch, D.B. Layzell, and A.M. Hirsch. 1998. Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfalfa. *Plant Physiol.* 117:385-95.
- Wymer, C.L., T.N. Bibikova, and S. Gilroy. 1997. Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 12:427-39.
- Wyss, P., R. Mellor, and A. Wiemken 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and non-nodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta.* 182:22-26.
- Xie, Z.P., C. Staehelin, H. Vierheilig, A. Wiemken, S. Jabbouri, W.J. Broughton, R. Vogeli-Lange, and T. Boller. 1995. Rhizobial Nodulation Factors Stimulate Mycorrhizal Colonization of Nodulating and Nonnodulating Soybeans. *Plant Physiol.* 108:1519-1525.
- Yang, W.C., C. de Blank, I. Meskiene, H. Hirt, J. Bakker, A. van Kammen, H. Franssen, and T. Bisseling. 1994. Rhizobium nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell.* 6:1415-26.
- Yang, W.C., P. Katinakis, P. Hendriks, A. Smolders, F. de Vries, J. Spee, A. van Kammen, T. Bisseling, and H. Franssen. 1993. Characterization of GmENOD40, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J.* 3:573-85.

Zorreguieta, A., C. Finnie, and J.A. Downie. 2000. Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component. *J Bacteriol.* 182:1304-12.