



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Biotecnología

Departamento de Biología Molecular de Plantas

Análisis de las NADPH oxidasas de las raíces de *P. vulgaris* en las etapas tempranas de la nodulación

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas

Presenta:

M. en C. Jesús Montiel González

bajo la asesoría de la

M. en C. Carmen Quinto Hernández



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

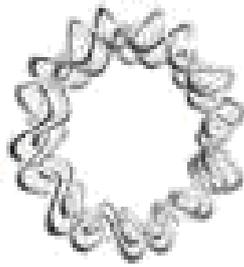


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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 se realizó en el departamento de biología molecular de plantas del Instituto de Biotecnología/UNAM, bajo la asesoría de la M. en C. Carmen Quinto Hernández. El proyecto fue parcialmente financiado por los donativos DGAPA-UNAM IN205609 y CONACYT 83324, 153718. Jesús Montiel González recibió una beca de doctorado por parte del CONACyT (número de beca 199262).

Agradezco los comentarios y sugerencias durante la realización del proyecto por parte de los integrantes de mi comité tutorial, los Dres Rocío Cruz (Instituto de Ecología, UNAM) y Mario Rocha (Instituto de Biotecnología, UNAM), así como también al Dr. Federico Sánchez (Instituto de Biotecnología, UNAM).

También agradezco la ayuda técnica brindada para la realización de este proyecto por parte de los técnicos laboratoristas Noreide Nava, Olivia Santana, Gabriel Guillén y Xochitl Alvarado (Instituto de Biotecnología, UNAM).

Esta tesis se la dedico especialmente a mi mamá, mis abuelos Benjamín González Martínez (†) y Lucila Montiel Rosete (†), así como a la familia Mecinas Montiel. Sin su ayuda no lo hubiera logrado.

Gracias

ÍNDICE

Abstract	6
Resumen	7
Introducción	8
Las NADPH oxidasas de plantas (RBOHs)	9
La simbiosis rhizobia-leguminosa	13
La invasión de las rhizobia a través del hilo de infección (HI)	14
Regulación de las EORs en estadios iniciales de la simbiosis rhizobia-leguminosa	15
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos particulares	18
Materiales y Métodos	19
Búsqueda de <i>PvRbohs</i> en base de datos	19
Análisis <i>in silico</i> de las <i>PvRbohs</i>	19
Germinación de las semillas de <i>P. vulgaris</i> y aplicación de tratamientos	20
Generación de las construcciones de ARNi y microARN para silenciar a las <i>PvRbohs</i>	22
Transformación de las raíces de <i>P. vulgaris</i> con las diferentes construcciones	24
Análisis de producción de EORs, crecimiento de la raíz y capacidad de nodulación en las raíces transgénicas	25
Análisis de la expresión génica por RT-qPCR	27
Análisis histológico y ultraestructural de los nódulos transgénicos	27
Medición de la fijación biológica del nitrógeno	28
Adquisición y procesamiento de imágenes	29
Resultados	30
Las <i>Rbohs</i> forman una familia génica de nueve miembros en <i>P. vulgaris</i>	30
Las <i>PvRbohs</i> se expresan de forma diferencial en órganos y tejidos de <i>P. vulgaris</i>	34
La abundancia de transcrito de los genes <i>PvRbohA-PvRbohC</i> varía en respuesta al tratamiento con FN y la inoculación con <i>Rhizobium</i>	35
El silenciamiento de los genes <i>PvRbohA</i> y <i>PvRbohB</i> reduce la nodulación	37
La progresión del HI se aborta en las raíces <i>PvRbohB</i> -RNAi	40
La acumulación de superóxido es menor en los primordios de nódulos de las raíces <i>PvRbohB</i> -RNAi	43
La estructura de los HI y los simbiosomas está afectada en los nódulos <i>PvRbohB</i> -RNAi	46
La fijación biológica del nitrógeno disminuye en los nódulos <i>PvRbohB</i> -RNAi	48
Las raíces <i>PvRbohB</i> -RNAi presentan menor densidad de raíces laterales y producción de EORs	49
Discusión	53
Los FN modifican la abundancia de transcrito de los genes <i>PvRbohA-PvRbohC</i>	53
<i>PvRbohB</i> juega un papel crucial en la invasión de <i>Rhizobium</i>	54
El silenciamiento de <i>PvRbohB</i> afecta el desarrollo de los primordios de nódulos	56
Los escasos nódulos de las raíces <i>PvRbohB</i> -RNAi presentan HI y simbiosomas anormales	57
<i>PvRbohB</i> participa en la generación de EORs en las raíces de <i>P. vulgaris</i>	59
Conclusiones	61
Perspectivas	62
Literatura citada	63
Tabla Suplementaria I	73
Tabla Suplementaria II	76
Abreviaturas	77

ABSTRACT

Plant NADPH oxidases (RBOHs, for respiratory burst oxidase homologs) have emerged as key players in the regulation of plant-pathogen interactions. Nonetheless, their role in mutualistic associations, such as the rhizobia-legume symbiosis, is poorly understood. In this work, nine members of the *Phaseolus vulgaris* *Rboh* gene family were identified. RT-qPCR assays showed that the transcripts of these genes were differentially accumulated in distinct organs and root tissues. The mRNA of one of these, *PvRbohB*, was the highest expressed in shoots, roots and nodules while *PvRbohA* transcript was the most abundant in root hairs. RNAi-mediated *PvRbohA* or *PvRbohB* down-regulation in transgenic roots greatly impaired nodulation. The present study was only focused on the phenotypic analysis of *PvRbohB*-RNAi roots. Microscopy analysis revealed that progression of the ITs (infection threads) was impeded at the base of root hairs in *PvRbohB*-RNAi roots. Furthermore, the few nodules that formed in *PvRbohB*-down-regulated roots displayed abnormally wide ITs and reduced nitrogen fixation. These findings indicate that this common bean NADPH oxidase is crucial for successful rhizobial colonization, probably by maintaining a proper ITs growth and shape. In addition, *PvRbohB* seems to have a relevant role in *P. vulgaris* roots, since reactive oxygen species production and lateral root density was reduced in *PvRbohB*-RNAi roots.

RESÚMEN

En los últimos años se ha descubierto que las NADPH oxidasas de plantas, conocidas como RBOHs (debido a sus siglas en inglés, respiratory burst oxidase homologs), son reguladores clave en interacciones planta-patógeno; sin embargo, su participación ha sido poco explorada en relaciones simbióticas, como la relación mutualista rizobia-leguminosa. En el presente trabajo se identificaron nueve *Rbohs* en el genoma de *P. vulgaris*. Los transcritos de estos genes se acumularon diferencialmente en distintos órganos y tejidos de raíz. El ARNm de uno de estos genes, el de *PvRbohB*, fue el que más acumuló en tallos, raíces y nódulos, mientras que el transcrito de *PvRbohA* fue el más abundante en pelos radicales. El silenciamiento de *PvRbohA* o de *PvRbohB* por ARN interferente en raíces transgénicas de frijol redujo notablemente su capacidad de nodulación. En el presente estudio nos enfocamos en analizar el fenotipo del silenciamiento de *PvRbohB*. Utilizando diferentes herramientas de microscopía se observó que la progresión de los hilos de infección (HI) se abortaba en la base del pelo radical de las raíces transgénicas *PvRbohB*-RNAi. Los pocos nódulos que se formaron en las raíces silenciadas en *PvRbohB* presentaron HI anormalmente más anchos y se redujo la fijación biológica del nitrógeno. Estos resultados indican que esta NADPH oxidasa de *P. vulgaris* desempeña un papel crucial en la simbiosis rizobia-*P. vulgaris* al permitir una colonización adecuada por parte del microsimbionte, probablemente al regular la estructura y progresión de los HI. Además, *PvRbohB* parece tener una participación importante en las raíces de *P. vulgaris*, ya que la generación de especies de oxígeno reactivas y la densidad de raíces laterales fue menor en las raíces *PvRbohB*-RNAi.

INTRODUCCION

Las EORs (especies de oxígeno reactivas) son moléculas generadas por la excitación de los electrones del O_2 , es decir, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno en singulete ($^1O_2^-$), así como las especies del oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Hansberg, 2002). En organismos eucariontes, estos radicales se producen constantemente en organelos con metabolismo oxidativo elevado o con un flujo intenso de electrones, como son los peroxisomas, las mitocondrias y los cloroplastos (Mittler et al., 2004). En los peroxisomas, la generación tanto del anión O_2^- como del H_2O_2 , se efectúa por la oxidasa de xantina en la matriz del organelo y por tres polipéptidos de la membrana del peroxisoma (PMP18, PMP29, PMP32) (Del Río et al., 2006). En las mitocondrias el anión O_2^- es un subproducto de la fosforilación oxidativa en los complejo I y III, cuando éstos se encuentra en su estado reducido (Møller, 2001). En los cloroplastos, en el centro de reacción del fotosistema I la fotoreducción del oxígeno lleva a la formación del O_2^- , mientras que en el fotosistema II, una intensidad de luz elevada puede conducir a la excitación del oxígeno para producir el $^1O_2^-$ (Asada, 2006). La regulación de los niveles de EORs en la célula es de suma importancia, ya que concentraciones elevadas de éstas causan peroxidación de lípidos, carbonilación de proteínas y afectan la estructura del ADN, lo que puede provocar mutaciones. Las EORs más dañinas son el radical $OH\cdot$ y el $^1O_2^-$, ya que los daños generados por éstas son irreversibles y en el caso de las proteínas, las marcan para su degradación (Hansberg, 2002).

Las células vegetales, al igual que otros organismos, poseen mecanismos específicos para regular los niveles de EORs, que consisten en la producción de ciertos metabolitos y la actividad de algunas enzimas. Tal es el caso del ascorbato y el glutatión, que son los metabolitos antioxidantes más abundantes y que junto con tocoferoles y carotenos previenen la peroxidación de lípidos. Entre las principales enzimas antioxidantes se encuentra la superóxido dismutasa, que se encarga de convertir el O_2^- en H_2O_2 y éste es convertido en agua por enzimas como la catalasa, la glutatión peroxidasa, la ascorbato peroxidasa o peroxidases de la pared celular (Apel y Hirt, 2004) (Tabla I). Dentro del sistema antioxidante también se han identificado otras proteínas con características antioxidantes, como son las tioredoxinas y las glutaredoxinas, las cuales catalizan la reducción de enlaces disulfuro a través de un sitio activo ditiol. La actividad de estas enzimas es de gran importancia para mantener el balance redox en la célula, ya que mediante su actividad de reductasas de enlaces disulfuro, restauran el poder reductor de otras proteínas antioxidantes como son las catalasas, las glutatión peroxidases y las peroxiredoxinas (Dos Santos y Rey, 2006).

Tabla I. Reacciones de los principales mecanismos enzimáticos empleados para detoxificar a la célula.

Mecanismo	Enzima	Reacción
Superóxido dismutasa	SOD	$O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
Catalasa	CAT	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Ciclo del Glutatión-Ascorbato	APX	$H_2O_2 + \text{Ascorbato} \rightarrow H_2O + \text{MDA}$
	MDAR	$\text{MDA} + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{Ascorbato} + \text{NAD(P)}^+$
	DHAR	$\text{Dehidroascorbato} + \text{GSH} \rightarrow \text{Ascorbato} + \text{GSSG}$
	GR	$\text{GSSG} + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{GSH} + \text{NAD(P)}^+$
Ciclo del Glutatión-peroxidasa	GPX	$H_2O_2 + \text{GSH} \rightarrow H_2O + \text{GSSG}$
	GR	$\text{GSSG} + \text{NAD(P)H} \rightarrow \text{GSH} + \text{NAD(P)}^+$

SOD superóxido dismutasa, CAT catalasa, APX ascorbato peroxidasa, MDA monodehidroascorbato (ascorbato oxidado), MDAR monodehidroascorbato reductasa, DHAR dehidroascorbato reductasa, GSH glutatión, GSSG glutatión oxidado, GR glutatión reductasa, GPX glutatión peroxidasa. Esquema tomado de Apel y Hirt (2004).

A pesar de los diversos daños que pueden ocasionar las EORs, se ha demostrado que participan en diversos procesos celulares en las plantas al ser generadas de manera transitoria y específica. En presencia de patógenos o de alguno de sus componentes, las plantas responden con una explosión oxidativa rápida, que consiste en una elevada generación de EORs y que forma parte de la respuesta hipersensible, la cual les permite contender contra el patógeno (Lamb y Dixon, 1997). Las EORs participan también en mecanismos de señalización (Heo y Campbell, 2006); se ha reportado la activación de canales de calcio en presencia de H_2O_2 , siendo el calcio uno de los principales segundos mensajeros utilizados en las células vegetales (Mori y Schroeder, 2004). En *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado que la presencia de H_2O_2 induce la expresión de la cinasa de serina/treonina *oxII*, la cual activa a las cinasas MPK3 y MPK6, que participan en el crecimiento radical y la defensa ante patógenos (Rentel et al., 2004).

Por otra parte, las EORs juegan un papel esencial en la biomecánica de la pared celular secundaria. Los radicales hidroxilo son capaces de escindir los xiloglicanos, lo que permite la expansión de las células vegetales, mientras que el H_2O_2 favorece la formación de lignina al polimerizar los compuestos fenólicos, en una reacción dependiente de las peroxidasa de pared celular (Liszky et al., 2003).

Las NADPH oxidasas de plantas (RBOH)

Las NADPH oxidasas fueron descritas en un principio en células fagocíticas humanas, donde se encontró que promovían la muerte de patógenos mediante la generación de EORs (Bedard et al., 2007). En plantas se les denomina RBOH (*respiratory burst oxidase homologue*) y a la fecha se han descrito genes homólogos en diferentes plantas modelo (Torres y Dangl, 2005). Las RBOHs son proteínas de membrana de aproximadamente 100 kD, que catalizan la generación de superóxido,

utilizando como sustrato el oxígeno molecular y como agente reductor la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Presentan seis regiones transmembranales, donde la tercera y la quinta, se unen a los dos grupos hemo a través de cuatro residuos de histidina. En el extremo amino-terminal se encuentran dos motivos de unión a calcio (EF-hands), mientras que en el carboxilo-terminal están las regiones de unión a flavina (FAD) y al NADPH (Figura 1) (Suzuki et al., 2011). Recientemente, el análisis cristalográfico de la región amino-terminal de la RBOHB de arroz, reveló que ésta puede formar dímeros estables en el motivo EF-hand (Oda et al., 2010). A diferencia de lo reportado en las NADPH oxidasas de células animales, en las RBOHs no se han encontrado subunidades regulatorias membranales. Sin embargo, en *Oryza sativa* se ha descrito que las ROP-GTPasas pueden unirse al extremo amino-terminal de las OsRBOHs y esta interacción podría jugar un papel en la regulación de las oxidasas, ya que plantas transgénicas de *O. sativa* que sobreexpresan una forma activa constitutivamente de una ROP-GTPasa (CA-OsRac) muestran mayor producción de EORs (Jones et al., 2007). La caracterización de mutantes puntuales en sitios de unión a calcio y de fosforilación en *AtRBOHD*, demostró que esta enzima es activada sinérgicamente por calcio y por fosforilación (Ogasawara et al., 2008). Por otra parte, Kobayashi et al., (2007) encontraron que las proteínas cinasas dependientes de calcio de *Solanum tuberosum* StCDPK4 y StCDPK5, activan la producción de EORs por StRBOHB al fosforilar residuos específicos de serina en su extremo amino-terminal. Asimismo, dos residuos de serina en el extremo amino-terminal de AtRBOHF también son susceptibles de fosforilación por la proteína cinasa OST1 (*open stomata* 1), lo cual sugiere que la fosforilación podría regular la actividad de esta oxidasa (Sirichandra et al., 2009).

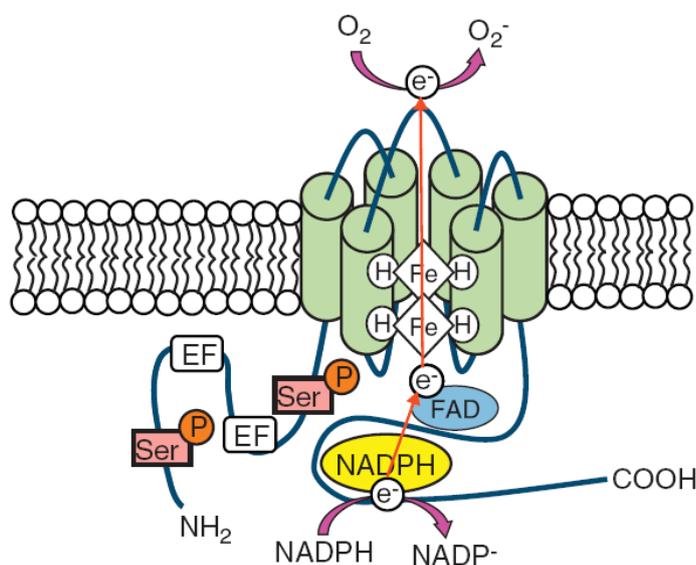


Figura 1. Representación gráfica de una RBOH. El extremo amino-terminal (NH_2) de las RBOHs, presenta residuos de serina (Ser^{P}) susceptibles a ser fosforilados por proteínas cinasas, así como motivos de unión a calcio (EF-hands). Hacia el carboxilo terminal se encuentran seis regiones transmembranales (RTM), donde la 3ra y 5ta RTM, contienen residuos de histidina (H) que forman parte del grupo hemo. La porción C-terminal intracelular (COOH), tiene los motivos de unión a flavina (FAD) y a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Imagen tomada de Suzuki et al., (2011).

El análisis de líneas transgénicas silenciadas y/o mutadas en las *Rbohs* ha revelado el papel esencial que desempeñan estas oxidasas en respuesta a estreses abióticos, mecanismos de señalización, procesos de desarrollo, así como en interacciones planta-patógenos (Miller et al., 2008; Torres, 2010; Suzuki et al., 2011). Enfoques farmacológicos sugieren fuertemente que las RBOHs son responsables tanto de la explosión oxidativa que se presenta en raíces de *Vicia faba* en respuesta a un estrés por plomo (Pourrut et al., 2008), como en plántulas de trigo, después de un tratamiento con níquel (Hao et al., 2006). Por otra parte, diversos reportes apuntan a que las EORs producidas por la actividad de RBOHs, son esenciales en procesos de señalización. Por ejemplo, la sobre-expresión de los genes *AtRBOHD* y *AtRBOHF* de *A. thaliana* disminuye la muerte celular descontrolada (MCD) bajo el fondo genético de la mutante *Isd1* (el gen *ISDI* codifica una proteína con dedos de zinc que regula negativamente la muerte celular), mientras que la mutación en los genes de estas oxidasas incrementa la MCD en dicho fondo genético (Torres et al., 2005). Estas oxidasas de *A. thaliana*, también se requieren para la generación de EORs durante el cierre de los estomas, en respuesta al tratamiento con ácido abscísico y metil jasmonato (Kwak et al., 2003). Sin embargo, el trabajo realizado por Miller y colaboradores (2009) en plantas de *A. thaliana*, demostró de forma más contundente el papel que juegan las EORs generadas por las RBOHs en procesos de señalización. Estos autores encontraron que una señalización sistémica rápida se desencadena después de un estrés salino, por herida, por calor, por frío y por luz intensa. Además, este mecanismo de señalización está acompañado por la generación de EORs en el espacio apoplástico de las células y depende de la presencia de *AtRBOHD* (Miller et al., 2009). Este trabajo, junto con otros reportes en la literatura han despertado un gran interés en analizar el papel de las EORs como moléculas señalizadoras en las células vegetales. Análisis transcriptómicos en *A. thaliana* han demostrado que el 37% de los transcritos que incrementan su abundancia en respuesta a O_2^- , no incrementan su acumulación en presencia de H_2O_2 (Suzuki et al., 2011). Esto indica que rutas de señalización distintas se desencadenan dependiendo del tipo de EOR al que se enfrente la planta. En este contexto, se ha encontrado que las *AtRBOHs* presentan expresión diferencial, dependiendo del estrés abiótico al que se enfrente la planta (Suzuki et al., 2011)

Otra faceta interesante de las EORs generadas por las NADPH oxidasas, es su participación en procesos de crecimiento y/o desarrollo, la cual se ha documentado en diferentes eucariontas, tanto unicelulares como multicelulares (Aguirre y Lambeth, 2010). En el caso concreto de plantas, se ha descrito que el silenciamiento de genes *Rbohs* en *Lycopersicon esculentum* produce efectos pleiotrópicos en órganos aéreos, como son: menor contenido de clorofila, reducción de la dominancia apical, así como flores anormales y estériles (Sagi et al., 2004). En *A. thaliana* se ha reportado que la longitud de la raíz primaria disminuye 20 y 35% en las líneas mutantes de los

genes *AtRBOHC* y *AtRBOHD*, respectivamente (Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003). En el mismo sentido, el tratamiento con el inhibidor de flavo enzimas (como las RBOHs) dyphenilene iodonium (DPI), disminuye la longitud de la raíz en plantas de *A. thaliana* (Dunand et al., 2007) y el tamaño del meristemo apical (Tsukagoshi et al., 2010). Sin embargo en las mutantes *atrbohC* y *atrbohD*, el tamaño del meristemo apical de las raíces no se encuentra afectado, lo cual sugiere que hay redundancia funcional entre estos genes para el mantenimiento del meristemo apical (Tsukagoshi et al., 2010). Los tubos polínicos de *Nicotiana tabacum* transformados con oligonucleótidos antisentido para las *NtRboh*s presentan menor actividad de NADPH oxidasa, menor generación de superóxido en la región apical de los tubos polínicos y disminución en su tasa de crecimiento (Potocky et al., 2007). En *A. thaliana*, se ha demostrado que la generación de EORs por la actividad de *AtRBOHC* es esencial para el crecimiento polarizado de los pelos radicales, ya que el fenotipo de la mutante en este gen, es la ausencia de pelos radicales (Foreman et al., 2003).

A pesar de la multifuncionalidad de las RBOHs, gran parte del conocimiento que se tiene sobre estas oxidadas, surgió del interés de analizar su participación en interacciones planta-patógeno, donde se ha visto que pueden actuar tanto como reguladores positivos, como reguladores negativos (Torres y Dangl, 2005; Sagi y Fluhr 2006). En *A. thaliana* se encontró que *AtRBOHD* es la principal responsable de la explosión oxidativa que se desencadena al percibir a la bacteria avirulenta *Pseudomonas syringae* y al parásito oomiceto *Peronospora parasitica* (Torres et al., 2002). El elicitor de origen fúngico criptogeina induce un incremento en la abundancia del ARNm y de la proteína *NtRBOHD* en hojas de *Nicotiana tabacum*. Además, el silenciamiento de *NtRbohD* mediante genética reversa demostró que esta oxidasa es necesaria para la generación de EORs después de percibir al elicitor (Simon-Plas et al., 2002). De igual forma, plantas de *Nicotiana bentamiana* silenciadas en *NbRbohA* y *NbRbohB* presentan menor acumulación de EORs y menor resistencia al patógeno *Phytophthora infestans* (Yoshioka et al., 2003). La penetración del hongo parasítico *Bulmeria graminis* también se ve favorecida en plantas de *Hordeum vulgare* silenciadas en el gen de la NADPH oxidasa *HvRbohF2* (Proels et al., 2010). Por el contrario, la mutante *atrbohF* de *A. thaliana* es menos susceptible a la cepa virulenta del oomiceto *P. parasitica* (Torres et al., 2002) y el silenciamiento de *HvRbohA* también confiere mayor resistencia a la invasión del hongo *B. graminis* en *H. vulgare* (Trujillo et al., 2006).

Como se describió previamente, las RBOHs han sido ampliamente estudiadas en interacciones planta-patógeno. No obstante, la participación de estas oxidadas en procesos simbióticos ha sido poco explorada y el único reporte del que se tiene conocimiento a la fecha, fue el descrito en la simbiosis de *Medicago truncatula* con *Sinorhizobium meliloti*. Marino et al., (2011) encontraron que nódulos de raíces transgénicas de *M. truncatula* silenciadas en el gen de la NADPH oxidasa

RbohA, presentan menor fijación biológica del nitrógeno, en comparación con raíces transgénicas control.

La simbiosis rhizobia-leguminosa

Una simbiosis de gran importancia agronómica, es la establecida entre bacterias del suelo denominadas rhizobia y las raíces de las leguminosas, ya que estas bacterias proveen a las plantas de una fuente asimilable de nitrógeno. El establecimiento de la simbiosis requiere de un intercambio de señales químicas entre ambos organismos (Oldroyd y Downie 2008). Por una parte, la planta libera constantemente a la rizósfera diversos compuestos, los cuales incluyen, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, amino ácidos y derivados fenólicos. Estos últimos son los que disparan el primer paso para la interacción simbiótica entre la bacteria y las raíces de las leguminosas (Perret et al., 2000). Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides y los isoflavonoides junto con las betaínas, los glucósidos y los ácidos aldónicos funcionan como quimioatrayentes de las bacterias, las cuales son atraídas hacia el ápice de los pelos radicales. Los flavonoides interactúan específicamente con un regulador transcripcional bacteriano, la proteína Nod D, induciendo así la transcripción de los genes llamados “*nod*”. Los genes *nod* codifican proteínas bacterianas que participan en la síntesis y secreción de metabolitos conocidos como “factores de nodulación” (FN) que en respuesta a los flavonoides, constituyen la segunda señal en el intercambio de señales químicas (Geurts et al., 2002).

Las raíces de las leguminosas presentan respuestas fisiológicas y celulares específicas en presencia de los FN, donde la gran mayoría de estas respuestas se han detectado en los pelos radicales (Murray, 2011). Por ejemplo, segundos después del tratamiento con FN, se ha observado un incremento en la concentración de Ca^{2+} y EORs en la zona apical de pelos radicales de *Phaseolus vulgaris* (Cárdenas et al., 1998; Cárdenas et al., 2008). El aumento en el influjo de calcio es seguido por un aumento en la salida de cloro y potasio en pelos radicales de *Medicago sativa* (Felle et al., 1998); este movimiento de iones, provoca la despolarización del potencial de membrana (Ehrhardt et al., 1992). Este flujo de iones, así como la despolarización del potencial de membrana, lleva a una alcalinización del citoplasma en pelos radicales de *M. sativa* (Felle et al., 1996). Alrededor de 15 minutos después de la percepción de los FN, se han observado oscilaciones en la concentración de calcio en la región nuclear de pelos radicales de *P. vulgaris* y *M. truncatula* (Cárdenas et al., 1999; Ehrhardt et al., 1996). Las oscilaciones de Ca^{2+} , coinciden espacio-temporalmente con la fragmentación y polimerización de los microfilamentos de actina de pelos radicales de *P. vulgaris* y *V. sativa* (Cárdenas et al., 1999; De Ruijter et al., 1999). Dentro de los

cambios morfológicos que presentan los pelos radicales, está la detención de su crecimiento de una a tres hrs después del tratamiento con FN, lo cual lleva a la hinchazón de la región apical de éstos. Esta respuesta, es seguida por el redireccionamiento del crecimiento apical del pelo radical y su bifurcación, a las 6 y 12 hrs, respectivamente (Cárdenas et al., 2000). La percepción de los FN también induce en las raíces de las leguminosas, un incremento en la abundancia de transcrito de ciertos genes conocidos como nodulinas tempranas y la reactivación de la división mitótica en las células corticales. Se ha postulado que estas respuestas que se observan en los pelos radicales y en las raíces de las leguminosas ante la presencia de los FN, son un pre-requisito para la infección por las rhizobia (Murray, 2011).

La invasión de las rhizobia a través del hilo de infección (HI)

El reconocimiento de las señales químicas específicas permite que las rhizobia se adhieran a la región apical del pelo radical y se generen diversos cambios a nivel molecular y celular en su hospedero (Gage, 2004). El primero de ellos es la deformación del pelo radical de la leguminosa, que consiste principalmente en un enroscamiento (Figura 2 I). El enroscamiento, permite la formación del hilo de infección (HI), que consiste en una estructura tubular por la cual ingresan las bacterias (Figura 2 II). Este proceso comienza con el ablandamiento de la pared celular en la región del enroscamiento, el cual es seguido por una invaginación de la membrana y la formación de pared celular nueva. Posteriormente, el HI migra hacia el interior del pelo radical, esta migración va dirigida por el núcleo del pelo y durante este trayecto las bacterias se encuentran en proceso de división (Figura 2 II). La caracterización molecular de este proceso ha permitido establecer que la progresión del HI en el pelo radical requiere de componentes del citoesqueleto como los microtúbulos y los microfilamentos de actina, así como también, una vapirina, una remorina, flotillinas, receptores tipo cinasa, enzimas involucradas en procesos de ubiquitinación y factores de transcripción (Popp y Ott, 2011).

De forma simultánea a la progresión del HI, las células del córtex reactivan procesos de división celular para formar el primordio del nódulo (Figura 2 III). En el caso de leguminosas que desarrollan nódulos indeterminados (meristemo persistente y con forma ovalada) la división es en el córtex interno, mientras que en las leguminosas con nódulos determinados (meristemo no persistente y forma redonda) ocurre en el córtex externo (Oldroyd y Downie, 2008). En estas etapas iniciales del proceso de nodulación, se incrementa la abundancia de los transcritos de nodulinas tempranas como *Enod2* y *Enod40*. Una vez que el HI llega a las células del córtex, éste se ramifica y libera a las bacterias, las cuales ingresan al citoplasma de dichas células, envueltas por una

membrana denominada peribacteroidal (Figura 2 IV). En estos nuevos organelos conocidos como simbiosomas, las bacterias sufren un cambio a bacteroides y es en éstos donde se expresa el complejo de la nitrogenasa y nitrogenasa reductasa, para realizar la fijación biológica del nitrógeno (Popp y Ott, 2011).

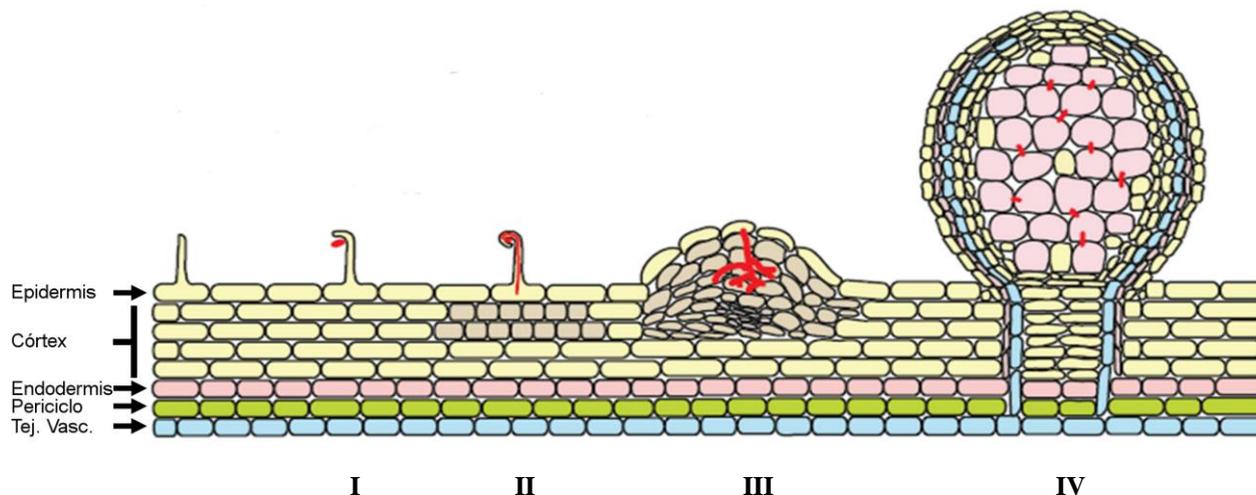


Figura 2. Esquema general del proceso de nodulación. El reconocimiento de las señales químicas específicas liberadas por las raíces de las leguminosas permite la adherencia de las rhizobia a los pelos radicales (I). Esto promueve el enroscamiento del pelo radical para la formación del HI, estructura por la cual las rhizobia ingresan a la raíz de la leguminosa (II). Simultáneamente las células corticales reactivan procesos de división celular para dar lugar a un primordio del nódulo, donde el HI se ramifica (III). El primordio del nódulo se desarrolla para formar un nódulo maduro donde las rhizobia son liberadas del HI y endocitadas en las células corticales, donde sufren un cambio a bacteroides. Estos últimos son los que realizan la fijación biológica del nitrógeno (IV) (Imagen tomada de Popp y Ott, 2011).

Regulación de las EORs en estadios iniciales de la simbiosis rhizobia-leguminosa

Durante las etapas tempranas del proceso de nodulación, se han observado cambios en los niveles de EORs en las raíces de las leguminosas (Becana et al., 2010). En raíces de *M. truncatula* la producción de H_2O_2 disminuye 1 hr después del tratamiento con FN o de la inoculación con su microsimbionte (Shaw y Long, 2003; Lohar et al., 2007). Esta respuesta coincide espacio-temporalmente con la hinchazón de los pelos radicales y la disminución de la abundancia de ARNm de *MtRboh2* y *MtRboh3* en las raíces de *M. truncatula*. La hinchazón de los pelos radicales también se observa cuando la generación de EORs se suprime por la adición del inhibidor DPI, lo cual sugiere que las RBOHs participan en la producción de EORs durante este proceso (Lohar et al., 2007). Además, la zona de la raíz de *M. truncatula* susceptible a la infección por las rhizobia, muestra gran generación de superóxido 12 hrs después de la inoculación con *S. meliloti*. Este incremento en la producción de superóxido no se desencadena en raíces inoculadas con una cepa de *S. meliloti* incapaz de sintetizar FN, lo cual sugiere que tal respuesta requiere la presencia de los FN (Ramu et al., 2002). El anión superóxido también se ha detectado en HI de pelos radicales de *M.*

sativa y primordios de nódulos de 5 días post-inoculación (dpi) de raíces de *M. truncatula* (Santos et al., 2001; Ramu et al., 2002). Resultados obtenidos por el grupo de Jamet et al., (2007), sugieren una participación importante de las EORs en los HI de *M. sativa*, debido a que estos autores detectaron un retraso en la nodulación en plantas inoculadas con una cepa de *S. meliloti* que sobreexpresa el gen de la catalasa *katB*. Además, los nódulos formados en las raíces inoculadas con dicha cepa presentaron menor acumulación de H₂O₂ en los HI y éstos últimos desarrollaron una estructura amorfa. Consistente con la idea de que las RBOHs participan en la generación de H₂O₂ en este proceso, se ha observado que la acumulación H₂O₂ en la matriz extracelular de los HI de nódulos de chícharo se previene con DPI (Rubio et al., 2004). Utilizando también enfoques farmacológicos, otros grupos de trabajo han encontrado que la nodulación se inhibe al agregar DPI a raíces de *Sesbania rostrata* y *M. truncatula* antes de la inoculación con sus respectivos microsimbiontes (D'Haese et al., 2003; Peleg-Grossman et al., 2007).

Tabla II. Cambios en los niveles de EORs en las raíces de algunas leguminosas durante las etapas iniciales de la simbiosis con las rhizobia.

Tiempo	Tratamiento	Respuesta	Organismo	Nota
2 min	FN	↑ H ₂ O ₂ en pelos radicales	<i>P. vulgaris</i>	El DPI inhibe la producción de H ₂ O ₂ ⁽¹⁾
1 hr	FN y rhizobia	↓ H ₂ O ₂ en raíces	<i>M. truncatula</i>	Depende del reconocimiento de los FN ⁽²⁾
12 hr	FN y rhizobia	↑ O ₂ ⁻ en raíces	<i>M. truncatula</i>	Depende del reconocimiento de los FN ⁽³⁾
5 dpi	Rhizobia	O ₂ ⁻ en HI y primordios de nódulo	<i>M. sativa</i>	⁽⁴⁾
5 dpi	Rhizobia	O ₂ ⁻ en primordios de nódulo	<i>M. truncatula</i>	⁽³⁾
5 dpi	Rhizobia	H ₂ O ₂ en HI de nódulos jóvenes	<i>M. sativa</i>	HI anormales al reducir los niveles de H ₂ O ₂ ⁽⁵⁾
30 dpi	Rhizobia	H ₂ O ₂ en HI de nódulos	<i>P. sativum</i>	El DPI reduce la producción de H ₂ O ₂ ⁽⁶⁾

↑, Aumento; ↓, Reducción; FN, factores de nodulación; dpi, días post-inoculación. ⁽¹⁾ Cárdenas et al., 2008; ⁽²⁾ Shaw y Long, 2003, Lohar et al., 2007; ⁽³⁾ Ramu et al., 2002; ⁽⁴⁾ Santos et al., 2001 ; ⁽⁵⁾ Jamet et al., 2007 ; ⁽⁶⁾ Rubio et al., 2004

Los antecedentes arriba mencionados muestran que hay cambios en los niveles de EORs en las raíces de las leguminosas durante el proceso de nodulación (Tabla II). Además, evidencia farmacológica apunta a que las RBOHs participan de manera significativa en la producción de EORs durante algunos de estos estadios. Dado que el interés de nuestro grupo de trabajo está enfocado en investigar las etapas iniciales de la interacción *P. vulgaris*-*R. etli*, se ha analizado el papel de las EORs durante dicho proceso. Se encontró que los pelos radicales de *P. vulgaris* responden con un incremento rápido y transitorio en la producción de EORs segundos después de la aplicación de FN. Esta respuesta parece estar regulada por flavo-enzimas como las RBOHs, ya que dicha respuesta no se despliega al incubar previamente las raíces con el inhibidor DPI (Cárdenas et al., 2008).

Estos resultados junto con los antecedentes descritos previamente sugieren fuertemente que las RBOHs podrían jugar un papel importante en la simbiosis rhizobia-leguminosa, sin embargo

gran parte del conocimiento que se ha recabado, se ha obtenido a partir de enfoques farmacológicos, utilizando inhibidores como el DPI, el cual no es un inhibidor específico de las RBOHs. Por tal motivo en el presente trabajo nos dimos a la tarea de evaluar la participación potencial de RBOHs de *P. vulgaris* durante los eventos iniciales de la simbiosis *P. vulgaris-Rhizobium* utilizando herramientas de genética reversa en plantas compuestas de *P. vulgaris*.

Hipótesis

Se propone que RBOHs que se expresan en las raíces de *P. vulgaris* tienen un papel esencial durante las etapas iniciales de la simbiosis *P. vulgaris*-rhizobia.

Objetivo general:

Analizar la participación de *Rbohs* que se expresan en las raíces de *P. vulgaris* durante los eventos tempranos de la relación simbiótica *P. vulgaris*-rhizobia.

Objetivos particulares:

- Identificar las *Rbohs* que se encuentran en el genoma de *P. vulgaris*.
- Realizar análisis *in silico* de las *Rbohs* identificadas en el genoma de *P. vulgaris*.
- Determinar el patrón de acumulación de los ARNm de las *Rbohs* (seleccionadas) en diferentes órganos y tejidos de *P. vulgaris*, así como en respuesta a los FN y la inoculación con *Rhizobium*.
- Generar raíces transgénicas de *P. vulgaris* silenciadas específicamente en la(s) *PvRboh(s)* que de acuerdo a los resultados anteriores pudiera(n) tener un papel potencial en la simbiosis.
- Realizar ensayos de nodulación en las raíces transgénicas para determinar el efecto del silenciamiento en la simbiosis de la(s) *PvRboh(s)* seleccionada(s).
- Monitorear el proceso de infección en las raíces transgénicas silenciadas en la(s) *PvRboh(s)* mediante diferentes herramientas de microscopía.
- Evaluar el efecto del silenciamiento de la(s) *PvRboh(s)* en la organización celular de los nódulos (en caso de haber nódulos).
- Examinar la ultraestructura de los nódulos generados (en caso de haber nódulos) en las raíces transgénicas silenciadas en la(s) *PvRboh(s)*.
- Analizar parámetros de crecimiento de la raíz y generación de especies de oxígeno reactivas en las raíces silenciadas en la(s) *PvRboh(s)*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de *PvRbohs* en bases de datos

Se realizó una búsqueda de secuencias con homología a *Rboh* en la base de datos del genoma de *P. vulgaris* depositada en el Phytozome (www.phytozome.net, Goodstein et al., 2012), mediante un Basic Local Alignment Tool (BLAST), empleando como sonda la secuencia codificante de *AtRbohD* (Torres et al., 1998). Con esta estrategia se obtuvo la secuencia de amino ácidos y genómica de nueve genes con homología a *Rboh*, los cuales nombramos: *PvRbohA*, *PvRbohB*, *PvRbohC*, *PvRbohD*, *PvRbohE*, *PvRbohF*, *PvRbohG*, *PvRbohH* y *PvRbohI*. La anotación de la base de datos de estas secuencias se encuentra en la Tabla Suplementaria I, junto con la anotación de las RBOHs de otras plantas.

Análisis *in silico* de las *PvRbohs*

Estructura génica de las *PvRboh* y *GmRbohs*

La organización génica de las *PvRbohs* y *Rbohs* de soja (*GmRbohs*) se predijo con el programa Wise2 – Intelligent algorithms for DNA research (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/Wise2/index.html>). En esta herramienta bioinformática se introdujo la secuencia genómica de cada *Rboh* y como secuencia de amino ácidos molde su correspondiente secuencia de amino ácidos predicha por Phytozome.

Porcentaje de identidad a nivel de amino ácidos entre las *PvRBOHs*

Con la secuencia deducida de amino ácidos de cada *PvRBOH*, se realizó un alineamiento múltiple entre las *PvRBOHs* con el programa T-Coffee (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular>). El alineamiento múltiple permitió identificar los diferentes motivos consenso que se han descrito en las RBOHs. Posteriormente se determinó el porcentaje de identidad entre cada *PvRBOH* mediante un alineamiento binario con el programa LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

Distribución filogenética de las *PvRBOHs*

La construcción del árbol filogenético se realizó con la secuencia deducida de amino ácidos de las RBOHs de *A. thaliana*, *G. max*, *L. japonicus*, *M. truncatula*, *P. vulgaris*, *P. trichocarpa*, *O.*

sativa y *V. vinifera*. Las secuencias de las RBOHs de *L. japonicus* y las otras plantas se obtuvieron de la base de datos Kasuza (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>) y Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), respectivamente. La nomenclatura de las RBOHs previamente descritas por otros grupos de trabajo se conservó en el presente trabajo (Torres et al., 2005; Wong et al., 2007; Lin et al., 2009; Marino et al., 2011), mientras que las RBOHs que aún no se han reportado, se les asignó una nomenclatura basada en su cercanía filogenética con las RBOHs de *A. thaliana*. Las secuencias de las RBOHs se alinearon y se les realizó 1,000 bootstrap N-J tree con el programa ClustalX versión 2.0.6. Posteriormente, los datos generados se graficaron con el software NJplot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>). La anotación de las RBOHs se encuentra en la Tabla Suplementaria I.

Germinación de las semillas de *P. vulgaris* y aplicación de tratamientos

Las semillas de *P. vulgaris* variedad negro Jamapa se desinfectaron de acuerdo a la siguiente metodología:

- Desinfección durante 5 min con hipoclorito de sodio (20%).
- Lavado 3 veces con agua destilada estéril para eliminar residuos de cloro.
- Lavado durante 1 min con alcohol etílico industrial.
- Lavado 3 veces con agua destilada estéril para eliminar restos de EtOH.

Posteriormente, las semillas se colocaron en charolas metálicas previamente esterilizadas (20 min a 120°C y 150 kPa.), cubiertas con papel aluminio y con una capa de papel absorbente humedecido con medio Fåhreaus* estéril (pH 7). Se incubaron por 48 hrs en una cámara de incubación a 28°C.

*Preparación del Medio Fåhreaus	
Compuesto	Concentración final
CaCl ₂	0.680 mM
MgSO ₄	0.486 mM
KH ₂ PO ₄	0.734 mM
Na ₂ HPO ₄	1.042 mM
Citrato férrico	18.5 µM
+MnZO ₄	12 µM
+ZnSO ₄	765.1 µM
+H ₃ BO ₃	46.25 µM
+CuSO ₄	320 µM
+H ₂ MoO ₄	38.8 µM
+ En su conjunto se conocen como trazas Gibson	

Obtención y procesamiento de muestras de diferentes tejidos y órganos de *P. vulgaris*

La obtención de los tejidos de las raíces de *P. vulgaris* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Manjula et al., (2009), esto es, la región apical (aproximadamente 3mm) de la raíz de cada plántula de *P. vulgaris* de 2 dpG se cortó y se colocó en un vaso de precipitado con nitrógeno líquido. El resto de la raíz se transfirió a otro vaso de precipitado con nitrógeno líquido en agitación suave para favorecer el desprendimiento de los pelos radicales y además, evitar quebrar las raíces. El vaso de precipitado donde se realizó este procedimiento se vertió en un colador de metal y se recuperó en otro recipiente el nitrógeno líquido enriquecido en pelos radicales. Las raíces que quedaron en el colador (raíces rasuradas: sin pelos radicales ni ápices de raíces). Los diferentes tejidos de las raíces de *P. vulgaris* se almacenaron a -70°C para los experimentos posteriores de RT-qPCR.

Por otro lado, también se utilizaron plántulas de 2 días post-germinación (dpG) para transferirlas a macetas con vermiculita estéril e inocularlas con *Rhizobium tropici* CIAT899 a una densidad óptica de 0.05 (600nm). Las plantas se crecieron en condiciones de invernadero y se irrigaron de forma regular con medio B & D (Broughton y Dilworth, 1971). Catorce días después de haber sido inoculadas con *Rhizobium*, se colectaron las hojas, tallos, raíces y nódulos de las plantas ($n > 20$ plantas por replica biológica). Las muestras se congelaron y maceraron en nitrógeno líquido para los experimentos posteriores de RT-qPCR.

Tratamiento con FN, quitosán y pentámeros de *N*-acetil glucosamina

Las plántulas de dos días post-germinación (dpG) se colocaron en cámaras de vidrio transparente (22x5x12cm) con medio Fåhreaus, de tal manera que la raíz quedara sumergida en el medio y se dejaron reposar durante 12 hrs antes de aplicar los diferentes tratamientos, para evitar estresar a las plántulas. Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se les agregaron FN ($1 \times 10^{-8}\text{M}$) o pentámeros de *N*-acetil glucosamina ($1 \times 10^{-8}\text{M}$), de acuerdo a protocolos previamente establecidos en el laboratorio (Cárdenas et al., 1998; Cárdenas et al., 2008). A las raíces control, se les agregó el buffer donde se resuspenden los FN (detergente CHAPS 0.001%). Finalmente las raíces de las plántulas fueron colectadas a las 3, 6 y 12 hrs después de la aplicación de los diferentes tratamientos y se congelaron inmediatamente en N_2 líquido para los experimentos posteriores de RT-qPCR.

Inoculación con *Rhizobium*

Para los ensayos de nodulación, se llevó a cabo el mismo procedimiento de inoculación con *R. tropici* CIAT899 descrito anteriormente. Las raíces control consistieron en plantas no inoculadas e

tuvieron la construcción de interés, verificada por PCR, se almacenaron en glicerol y se utilizaron para inducir la formación de raíces transgénicas en *P. vulgaris*.

Por otra parte, para generar la construcción que serviría como control en las raíces transgénicas de *P. vulgaris*, el plásmido pENTR-premiR159a se digirió con la enzima de restricción *SacI*, para liberar una parte del mir159 de *A. thaliana* de tal forma que no pudiera producirse un microARN. El plásmido se religó con la enzima T4 DNA-Ligasa y se recombinó con el vehículo PH7WG2D.1, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Para disminuir la abundancia de transcrito de los genes *PvRbohA* y *PvRbohB* de forma específica, se utilizó la región 3' UTR de sus ARNm para generar un ARN interferente (ARNi). Mediante PCR se amplificó un fragmento de 219 pb del ARNm de *PvRbohA* y de 105 pb del transcrito de *PvRbohB* con la enzima PFU DNA polymerase (Fermentas), para su posterior clonación en el vector pENTR (Invitrogen). El juego de oligonucleótidos que se empleó fue el siguiente:

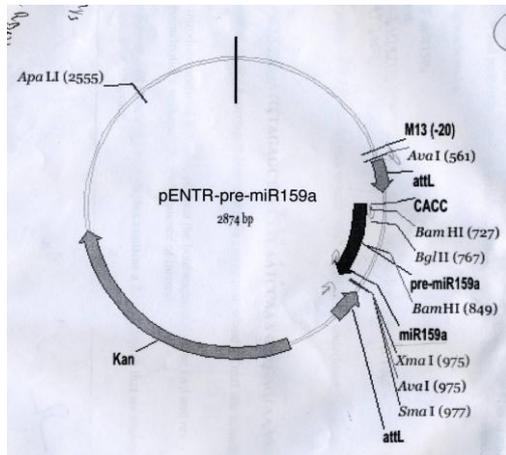
<i>PvRbohA</i> -ARNi:	SilRA-Up	CTGACAGGATAAGAAGTGAAGGATG
	SilRA-Lw	CACCGACACTGAGACACATCCA
<i>PvRbohB</i> -ARNi:	SilRB-Up	CGTGTGTAGTTAAGGGAAATATGC
	2SilRB-Lw	CACCATGTATGTCTAACTCCAATCG

Una vez clonados los productos de PCR en el vector pENTR, se transformaron células quimio-competentes TOP10 de *E. coli* y se verificaron las colonias positivas mediante ensayos de PCR utilizando los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el producto de PCR. Se extrajo el plásmido de las colonias positivas de cada una de las construcciones y se recombinó con el vector binario pTdT-RNAi (Figura 4b) a concentraciones equimolares (50 fentomolas) con la enzima LR-Clonasa de acuerdo al manual descrito por el distribuidor (Invitrogen). Con el producto de recombinación se transformaron células quimiocompetentes DH5 α de *E. coli* y se verificó la inserción correcta mediante ensayos de PCR utilizando los oligonucleótidos internos del vector (WKY3Forward y WKY5Reverse) y los oligonucleótidos específicos para cada una de las construcciones. Se aisló el plásmido de cada una de éstas y se comprobó la orientación correcta del inserto al secuenciar con los oligonucleótidos internos del vector.

Para generar la construcción que serviría como control en las raíces transgénicas, se recombinó el vehículo pTdT-RNAi con el pENTR digerido con la enzima *SacI*, como se describió previamente.

La cepa K599 de *A. rhizogenes* se transformó con cada uno de los plásmidos y se verificaron las colonias mediante ensayos de PCR. Las colonias positivas se almacenaron en glicerol y se crecieron en cajas petri para proceder con la transformación de las raíces de *P. vulgaris*.

(a)



(b)

Pre-mir159a cloned (277pb):

```

caccACAGTTTGCTTATCTCGGATCCATAATATATTTGACAAGATACTTT
GTTTTTCGATGATGATGATCTGACGATGGAAGTASACCTCTTAAAGTT
CAAACATGAGTTGAGCAGGGTAAAGAAAAGCTGCTAAGCTATGGATCCCA
TAAGCCCTAATCCTTGTAAGTAAAAAGGATTGGTTATAATGGATTGCA
TATCTCAGGAGCTTAACTTGCCCTTAAATGGCTTTTACTCTTCTTTGGGA
TTGAAGGSACCTTACATCCGGGTCA

```

Secuencia del *mir159a** (negrita) y *mir159a* (negrita e itálica). Sitios de restricción para *Bgl* II, *Xma* I y *Sac* I están resaltados en azul, verde y rojo, respectivamente.

Oligonucleótidos:

WT *mir159a*
Ewd:
GAT **SACCT** TGA TCT GAC GAT GGA AG TAGAGTCTCTTAAAGTTCAAA CAT
GAG TTG AGC AG

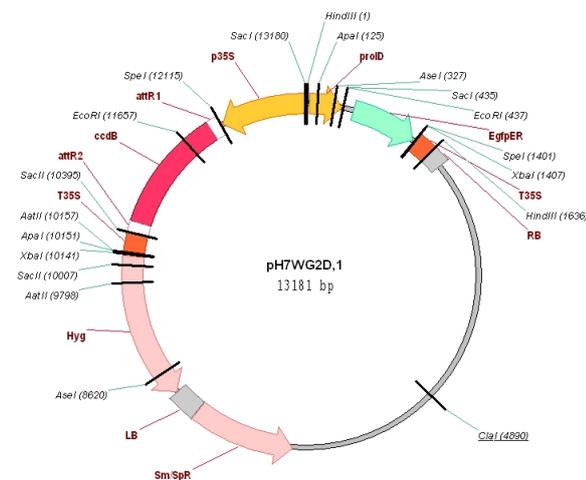
Secuencia en negrita corresponde al *mir159a**. En azul sitio *Bgl* II.

Rev:
TGA **CCGGG** ATG TAGAGTCTCTTCAATCCAAA GAA GAG TAA AAG CC

Secuencia en negrita e itálica corresponde al *mir159a* (hebra antisentido). En verde sitio *Xma* I.

Figura 3. (a) Mapa del vehículo pENTR-premiR159a. La flecha negra esquematiza la secuencia del premiR159a de *A. thaliana*. Para clonar un microARN en este vehículo se digiere el plásmido con *Bgl*III y *Xma*I. (b) Secuencia del premiR159a clonado en el pENTR-premiR159a. Las regiones en amarillo corresponden a la secuencia que forma el mir159 de *A. thaliana*. Esta secuencia presenta dos sitios de restricción para *Sac*I. Las secuencias marcadas en azul y verde, corresponden a los sitios de restricción para *Bgl*III y *Xma*I, respectivamente.

(a)



(b)

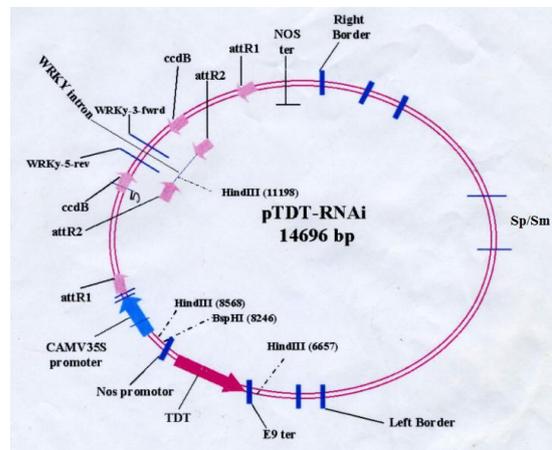


Figura 4. Mapa de los vehículos binarios utilizados para sobre-expresar el microARN y generar los ARNi. (a) El vector PH7WG2D.1 se utilizó para sobre-expresar el Mir-*PvRbohC*; este vehículo sobre-expresa *en planta* la proteína verde fluorescente EgfpER, la cual sirve como marcador molecular. (b) El vehículo pTDT-RNAi (Valdés-López et al., 2008) se usó para generar los ARNs interferentes (ARNi); el vector expresa de forma constitutiva la proteína roja fluorescente TdT (Jang et al., 2007).

Transformación de las raíces de *P. vulgaris* con las diferentes construcciones

Plántulas de 2 dpg se transfirieron a tubos de vidrio con medio B & D líquido y se les infringió una herida con una aguja hipodérmica en el nodo cotiledonar (Figura 5a). Sobre la herida, se les agregó una gota del cultivo de *A. rhizogenes* K599 transformado con cada una de las diferentes construcciones, de acuerdo a lo descrito por Estrada-Navarrete et al., (2007). Dos semanas después de agroinfiltrar, se observaron las *hairy roots* (raíces transformadas por *A. rhizogenes*) en un microscopio estereoscópico de epifluorescencia (SZX7 Olympus) para descartar las raíces no fluorescentes (Figura 5b). Las plantas con las raíces fluorescentes fueron colocadas en macetas con vermiculita o bien, en tubos de vidrio con medio B & D, para los experimentos posteriores.

Análisis de producción de EORs, crecimiento de la raíz y capacidad de nodulación en las raíces transgénicas

La acumulación de superóxido se analizó en raíces transgénicas control y *PvRbohB*-RNAi (n > 10) de 10 días post-emergencia (dpe) y de 5 y 7dpi con *R. tropici* CIAT899 crecidas en vermiculita o en medio aeropónico. Las raíces se sacaron de las macetas o de los tubos con sumo cuidado para evitar el daño mecánico y se seleccionaron únicamente las raíces fluorescentes en un microscopio estereoscópico de epifluorescencia. Las raíces fluorescentes se colocaron en un buffer de fosfato de sodio (10mM, pH 7.8) y se desgasificaron en un SAVANT durante 1 hora. Después, las raíces se transfirieron a un buffer de fosfato de sodio (10mM, pH 7.8) con nitroblue tetrazolium (NBT, SIGMA 0.1%) y se dejaron incubando (modificado de Ramu et al., 2002). Después de 10 a 15 min del tratamiento con el NBT, las raíces se colocaron en etanol para detener la reacción y finalmente se tomaron las imágenes en un microscopio estereoscópico. La producción de H₂O₂ también se evaluó en los tejidos mencionados anteriormente, pero con la sonda fluorescente 5-(y 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA). Las raíces transgénicas control y *PvRbohB*-RNAi se colocaron en cajas petri con CM-H₂DCFDA (30-50µm) disuelto en medio B & D. Después de 15 min de incubación, se tomaron imágenes en un microscopio estereoscópico de epifluorescencia. La intensidad de la fluorescencia se calculó con el software Adobe PhotoShop 5.5, de acuerdo a lo descrito por Park et al., (2003). Se delimitó la misma área para cada una de las imágenes y posteriormente utilizamos la herramienta histograma para determinar la intensidad de píxeles en el campo de fluorescencia verde. Es importante

mencionar que las raíces transgénicas control y *PvRbohB*-RNAi fueron procesadas simultáneamente y bajo las mismas condiciones.

La evaluación de parámetros de crecimiento de la raíz se llevó a cabo en 23 raíces transgénicas control y 37 raíces *PvRbohB*-RNAi, de acuerdo a la representación gráfica de la Figura 5c. Este análisis consistió en medir la longitud de cada raíz principal, así como determinar la densidad de raíces laterales con la siguiente fórmula $D=LR/L'$, donde: D= densidad; LR= número de raíces laterales y L' = longitud de la raíz principal entre la primera y la última raíz lateral observada (Dubrovsky et al., 2006). Estas raíces transgénicas de 10 dpe también se emplearon para evaluar la especificidad y eficiencia de las construcciones de interés a través de ensayos de RT-qPCR.

Los ensayos de nodulación se efectuaron en raíces transgénicas de plantas cultivadas en macetas con vermiculita estéril, de acuerdo al protocolo del ensayo de nodulación en raíces de plantas tipo silvestre, descrito previamente. Se contabilizó el número de primordios de nódulos y/o nódulos a los 5 y 14 dpi con *Rhizobium etli*-GFP (cepa donada amablemente por el Dr. Mario Aguilar, Centro Científico y Tecnológico-La Plata, CONICET, 1900 La Plata, Argentina), utilizando un microscopio estereoscópico de epifluorescencia. Esta metodología también se utilizó en las raíces transgénicas inoculadas con *Rhizobium tropici*-GUS (Vinuesa et al., 2002), para monitorear los eventos de infección por tinción de GUS.

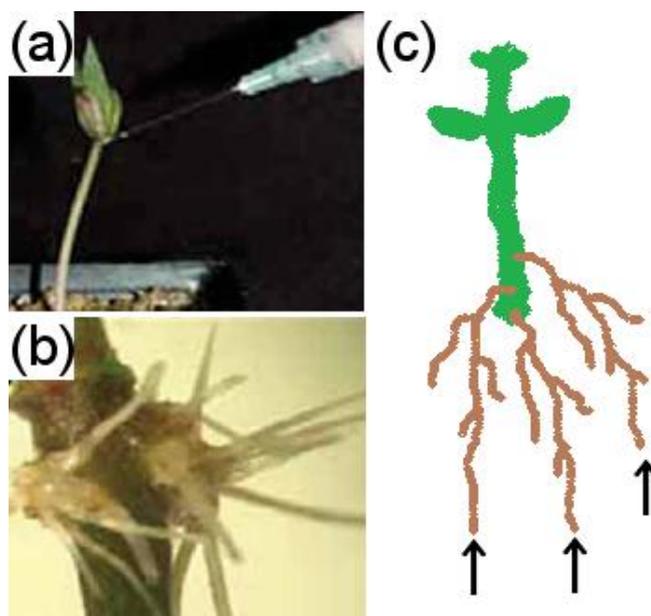


Figura 5. Pasos para la obtención de raíces transgénicas. (a) Plántula de *P. vulgaris* infectada por *A. rhizogenes* en el nodo cotiledonar con una jeringa hipodérmica. (b) Raíces transgénicas emergidas del nodo cotiledonar. (c) Representación gráfica de una planta compuesta de *P. vulgaris* con tres raíces transgénicas independientes. Las flechas señalan las raíces principales de cada raíz transgénica.

Análisis de la expresión génica por RT-qPCR

Se extrajo ARN total con TRIZOL (Invitrogen) de las muestras previamente congeladas, siguiendo las indicaciones del distribuidor. La integridad del ARN se verificó en un gel de agarosa mediante electroforesis y su concentración se determinó en un NanoDrop (Thermo Scientific 2000c). La contaminación de ADN genómico se eliminó con DNAsa libre de RNAsa (1 unit/ μ l Roche) durante 15 min a 37°C; la DNAsa se inactivó al incubar las muestras por 10 min a 65°C. Para corroborar la ausencia de ADN genómico en las muestras de ARN, éstas se utilizaron como templado para un ensayo de PCR (polymerase chain reaction) semi-cuantitativo y el producto del PCR se verificó en un gel de agarosa por electroforesis. Las muestras de ARN libres de contaminación con ADN se utilizaron para los ensayos de RT-qPCR con el kit iScript™ One-step RT-PCR Kit with SYBR® 192 Green (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del distribuidor en un termociclador iQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). Cada reacción de RT-qPCR se realizó con 40 ng (10ng/ μ l) de ARN como templado. Para confirmar la ausencia de ADN genómico en el ensayo, se incluyó una reacción sin transcriptasa reversa. La expresión relativa de cada uno de los genes en estudio se calculó con la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct$ del gen de interés menos el Ct del gen de referencia. Como gen de referencia se empleó al factor de elongación *EFl α* (Blanco et al., 2009; Zanetti et al., 2010; Islas-Flores et al., 2011). Los oligonucleótidos específicos, listados en la Tabla Suplementaria 1 (Tabla S2), se diseñaron de acuerdo a las recomendaciones del distribuidor del Kit SYBR® 192 Green (Bio-Rad). Para cada par de oligonucleótidos se determinó la presencia de una banda única del tamaño esperado al visualizar el producto de PCR en un gel de agarosa por electroforesis, así como mediante el análisis de la curva de disociación en los ensayos de RT-qPCR.

Análisis histológico y ultraestructural de los nódulos transgénicos

Los nódulos de las raíces transgénicas de siete dpi con *R. etli*-GFP, se procesaron de acuerdo a lo descrito en Sánchez-López et al., (2011). Esto es, las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5ml con solución fijadora (paraformaldehído 4%, glutaraldehído 2.5% en buffer fosfato-Na 0.1M, pH 7.2 o cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.2), utilizando 1.5ml de fijador por cada 100 μ l de tejido (volumen que ocupaba el tejido en el tubo). Los tubos con la tapa abierta y sellados con parafilm (con pequeñas perforaciones) se sometieron a vacío durante 1 hr a temperatura ambiente y después se dejaron a 4° C durante 48 hrs. Se descartó la solución y se realizaron tres lavados con

cacodilato de Na 0.1M pH 7.2. Se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1% durante 2 hrs a temperatura ambiente protegidas de la luz. Para la inclusión en la resina, se deshidrataron mediante lavados de 15 min a 4° C con etanol:

- 10 % EtOH
- 20 % EtOH
- 30 % EtOH
- 50 % EtOH
- 70 % EtOH (continuar deshidratación o guardar a 4 °C)
- 80 % EtOH
- 90 % EtOH
- 100 % EtOH (2 X)

Las muestras se embebieron paulatinamente en resina LR White a 4° C mediante cambios sucesivos:

- EtOH abs : LRWhite (2:1) 1h - toda la noche
- EtOH abs : LRWhite (1:1) 1 h
- EtOH abs : LRWhite (1:2) 1 h
- LRWhite (100%) 12-16 h
- LRWhite (100%) 2 h

La resina se polimerizó con luz UV a -20° C durante 48 hrs. Una vez polimerizada la resina, se realizaron cortes semi-delgados y ultra-delgados (0.5-1.0µm y 60-80nm, respectivamente) con un ultramicrotomo (Ultracut Leica). Los cortes semi-delgados se tiñeron con azul de toluidina al 0.1% y se colectaron las imágenes en un microscopio de campo claro (DMLB Leica). Las muestras de cortes ultra-delgados se post-fijaron en acetato de uranilo al 2% y se examinaron en un microscopio de transmisión de electrones a 50kV (Zeiss EM900).

Medición de la fijación biológica del nitrógeno

Raíces transgénicas de 28 dpi con *R. etli*-GFP crecidas en macetas con vermiculita se transfirieron a botellas de vidrios selladas con tapas de goma y se les inyectó acetileno a una concentración final del 10%. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y la producción de etileno se cuantificó en un cromatógrafo de gases Variant model 3300 (Ramírez et al., 1999). Posteriormente se quitaron los nódulos de las raíces transgénicas y se secaron a 65° C durante 48 horas para determinar su peso seco en un balanza analítica. La actividad específica se expresó en μmol^{-1} de etileno $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso seco de nódulo.

Adquisición y procesamiento de imágenes

Las imágenes de microscopía confocal y de epifluorescencia se adquirieron con un microscopio LSM 510 Meta (Zeiss) y con una cámara CCD (CoolSNAP HQ2; Photometrics) acoplada a un microscopio invertido Nikon TE300, respectivamente. Las proteínas fluorescentes se excitaron con una lámpara de xenón (330-700 nm) como fuente de iluminación (DG-4; Sutter Instruments). Las imágenes digitales se documentaron con una cámara AxioCam MRCc CCD (Zeiss) y un software de adquisición de imágenes AxioVision. El procesamiento de los datos se llevó a cabo con la paquetería Adobe PhotoShop versión 7.0 e ImageJ (NIH).

RESULTADOS

Las *Rbohs* forman una familia génica de nueve miembros en *P. vulgaris*

Con la finalidad de analizar la participación de las *Rbohs* de *P. vulgaris* en la simbiosis con *Rhizobium*, nos dimos a la tarea de identificar las *Rbohs* que se encuentran en el genoma de *P. vulgaris*. Para cumplir este propósito, se realizó una búsqueda de secuencias con homología a *Rboh* mediante un BLAST en el genoma de *P. vulgaris*, cuya secuencia fue recientemente liberada en la base de datos Phytozome (www.phytozome.org). Como resultado de la búsqueda, se identificaron 9 genes, los cuales se denominaron *PvRbohA-PvRbohI*. La nomenclatura se basó en su homología con las RBOHs de *A. thaliana*, ya que gran parte del conocimiento que se tiene sobre las RBOHs, ha surgido del estudio de las AtRBOHs (Suzuki et al., 2011). Es importante mencionar que los genes *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC*, se identificaron en el laboratorio a través de diferentes estrategias experimentales, antes de la liberación de la base de datos de la secuencia del genoma de *P. vulgaris* (25 de Febrero del 2012), mientras que los genes *PvRbohD-PvRbohI* se identificaron gracias a la disponibilidad de la secuencia genómica de *P. vulgaris*. Por tal motivo, algunos experimentos de RT-qPCR y los ensayos de genética reversa se llevaron a cabo únicamente para los genes *PvRbohA-PvRbohC*. El tamaño de la familia génica de las *PvRbohs* es similar al que se encontró en otras plantas cuyo genoma esta parcialmente o totalmente secuenciado (Tabla III). Al analizar la estructura génica de las *PvRbohs*, se encontró que estos genes presentan hasta 14 posibles intrones, de los cuales 7 están conservados en las *PvRbohs* (Figura 6a). Esta estructura génica es similar a la observada en las 9 probables secuencias ortólogas de *Glycine max* (Figura 6b) y en las *AtRbohs* (Torres et al., 1998).

Tabla III. Tamaño de la familia génica *Rboh* en algunas plantas con el genoma parcialmente o totalmente secuenciado^a.

	Organismo	Número de miembros
Monocotiledóneas	<i>O. sativa</i>	9 ^a
	<i>Z. mays</i>	11 ^a
Dicotiledóneas no leguminosas	<i>A. thaliana</i>	10 ^a
	<i>P. trichocarpa</i>	9 ^a
	<i>V. vinifera</i>	6 ^a
Leguminosas	<i>G. max</i>	18 ^a
	<i>L. japonicus</i>	5
	<i>M. truncatula</i>	7
	<i>P. vulgaris</i>	9

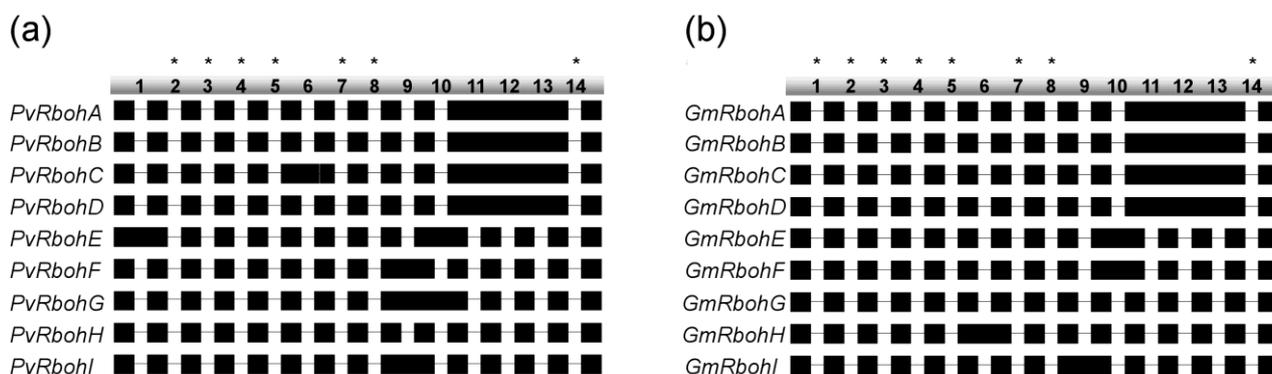


Figura 6. Estructura génica de las *Rbohs* de *P. vulgaris* y *G. max*. Representación gráfica de los genes *PvRbohs* (a) y *GmRbohs* (b). Los cuadros negros representan los exones y las líneas grises los intrones. Los asteriscos indican los intrones conservados en cada familia génica.

El análisis bioinformático de la secuencia deducida de amino ácidos de las PvRBOHs demostró que contienen cada uno de los motivos consenso descritos para estas oxidasas (Figura 7; Sagi y Fluhr, 2006). A través de alineamientos binarios se encontró que el porcentaje de identidad entre las PvRBOHs fluctúa entre el 37% y el 85% (Tabla IV). Con la finalidad de obtener mayor información *in silico* de estas oxidasas de *P. vulgaris*, se construyó un árbol filogenético. En este análisis, se comparó la distribución filogenética de las PvRBOHs con la de RBOHs de otras leguminosas (*G. max*, *Lotus japonicus* y *M. truncatula*) y no leguminosas con el genoma totalmente secuenciado (*A. thaliana*, *O. sativa*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* y *Zea mays*). Las RBOHs de *P. vulgaris* se agruparon en subclados con RBOHs de otras leguminosas, lo cual refleja la cercanía filogenética entre miembros de la misma familia taxonómica (Figura 8). Además, cada una de las nueve PvRBOHs tiene dos RBOHs equivalentes en *G. max*, lo cual es de esperarse debido al evento reciente de duplicación genómica en soya, posterior a su divergencia con *P. vulgaris* (Schmutz et al., 2010). Por lo tanto, esto sugiere que en efecto la familia génica de las *Rbohs* en *P. vulgaris* está conformada de nueve miembros. El análisis filogenético también reveló que PvRBOHD es la probable secuencia ortóloga de MtrBOHA de *M. truncatula*, la cual se ha reportado que su silenciamiento lleva a una menor fijación biológica del nitrógeno en los nódulos de *M. truncatula* (Marino et al., 2011).

Tabla IV. Porcentaje de identidad entre las PvRBOHs.

	<i>PvRBOHA</i>	<i>PvRBOHB</i>	<i>PvRBOHC</i>	<i>PvRBOHD</i>	<i>PvRBOHE</i>	<i>PvRBOHF</i>	<i>PvRBOHG</i>	<i>PvRBOHH</i>
PvRBOHB	57.8							
PvRBOHC	69.0	57.0						
PvRBOHD	56.9	84.9	55.9					
PvRBOHE	46.6	51.5	44.3	49.1				
PvRBOHF	49.3	53.8	49.7	53.7	53.8			
PvRBOHG	39.0	51.5	37.6	40.8	40.4	41.6		
PvRBOHH	42.8	47.9	44.5	46.2	44.3	45.5	38.2	
PvRBOHI	49.7	53.3	50.0	54.1	53.1	80.8	40.4	44.9



Figure 7. Alineamiento múltiple de las PvRBOHs. Los asteriscos indican los residuos conservados y las flechas los residuos de histidina que forman el grupo hemo. RTM I-VI: regiones transmembranales. EF I-II: EF hands. FAD: región de unión a flavina. NADPH-adenine: motivo de unión a NADPH-adenine. NADPH-ribose: motivo de unión a NADPH-ribose.

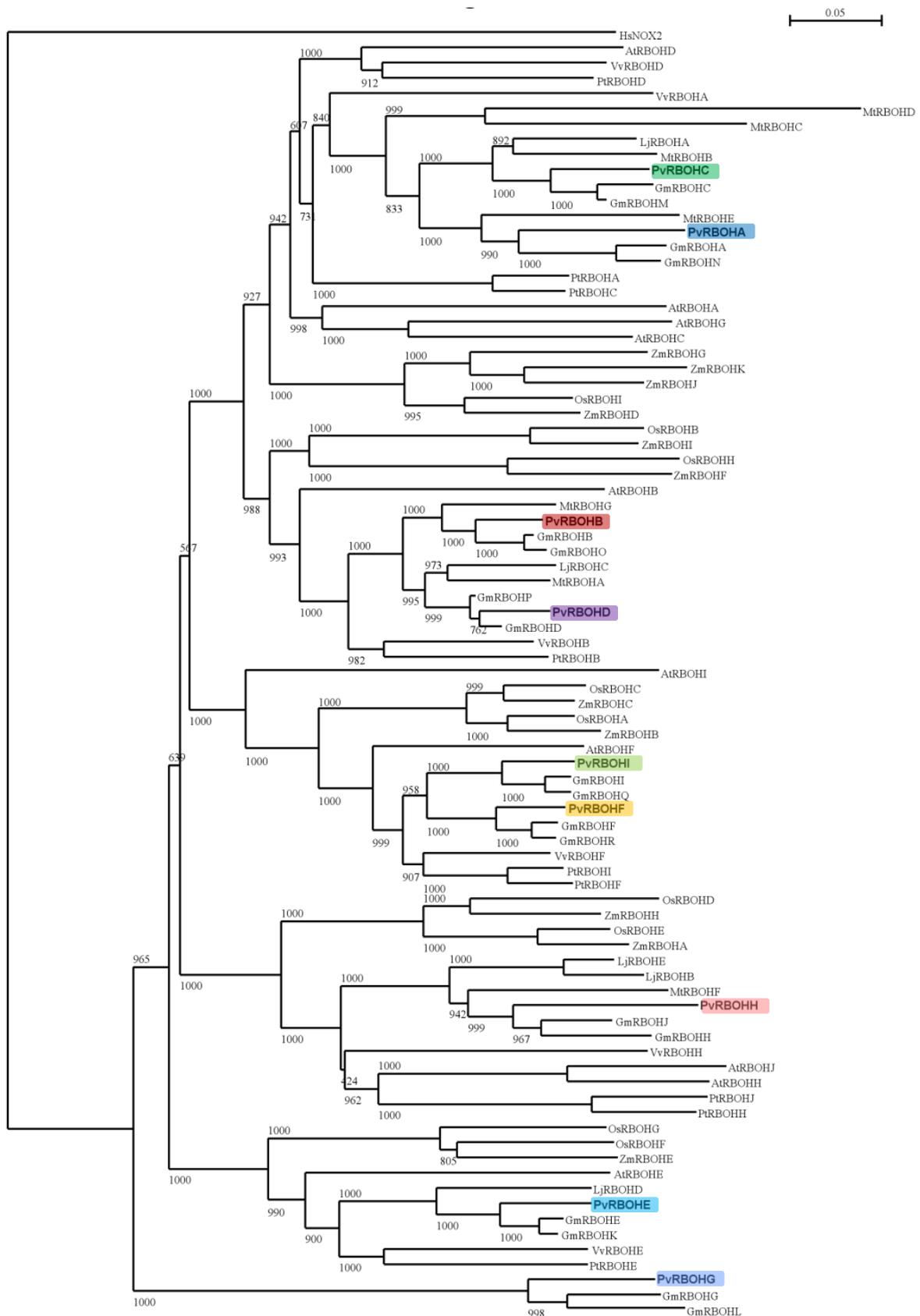


Figura 8. Árbol filogenético de algunas RBOHs. Distribución filogenética de las RBOHs de *A. thaliana*, *G. max*, *L. japonicus*, *M. truncatula*, *O. sativa*, *P. vulgaris*, *P. tricocharpa*, *V. vinifera* y *Z. mays*. La secuencia HsNOX2 (NADPH oxidasa de humano) se incluyó en el árbol filogenético como raíz. Los valores de Bootstrap están indicados en los nodos. Los números de acceso y anotaciones de las secuencias RBOHs se encuentran en la Tabla Suplementaria I. El árbol se generó con el programa NJ-plot.

Las *PvRbohs* se expresan de forma diferencial en órganos y tejidos de *P. vulgaris*

Estudios de expresión génica en diferentes plantas han revelado que algunas *Rbohs* se expresan de forma preferencial en ciertos órganos o tejidos (Sagi y Fluhr, 2006). Para definir el perfil de acumulación de los transcritos *PvRbohs* en diferentes órganos de *P. vulgaris*, se realizaron ensayos de RT-qPCR, utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de las nueve *PvRbohs* y como templado ARN extraído de hojas, tallos, raíces y nódulos de plantas cosechadas a los 14 dpi con *Rhizobium tropici* CIAT899. Los resultados obtenidos muestran que los transcritos de los genes *PvRbohA-PvRbohD*, son los que se acumularon de forma más abundante en los distintos órganos analizados, mientras que los genes *PvRbohF-PvRbohH* mostraron una expresión relativa baja en cada órgano estudiado (Figura 9a). Además, cabe destacar que el transcrito *PvRbohB* es el más abundante en tallos, raíces y nódulos (Figura 9a).

(a)

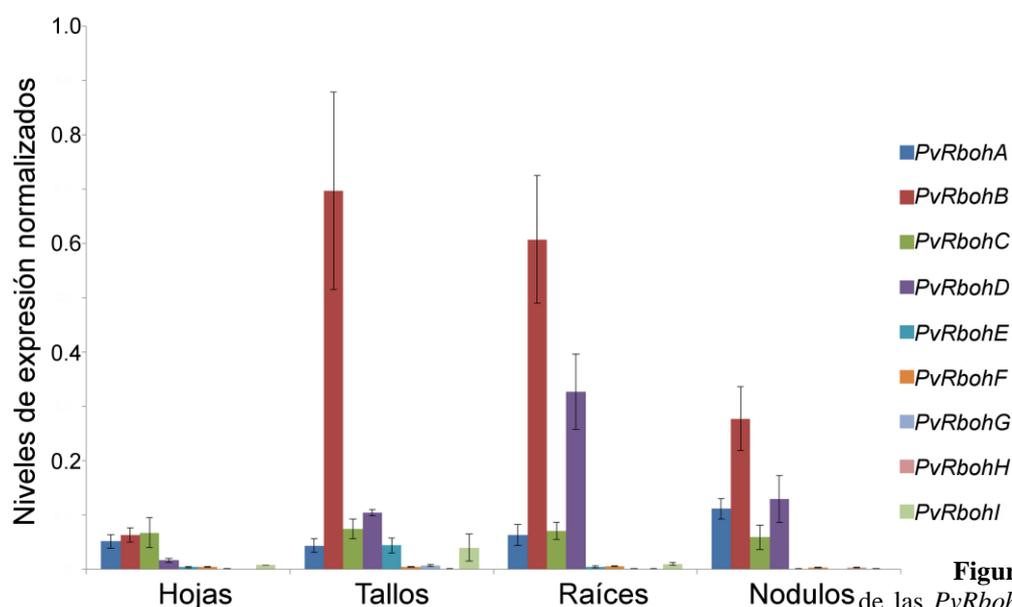
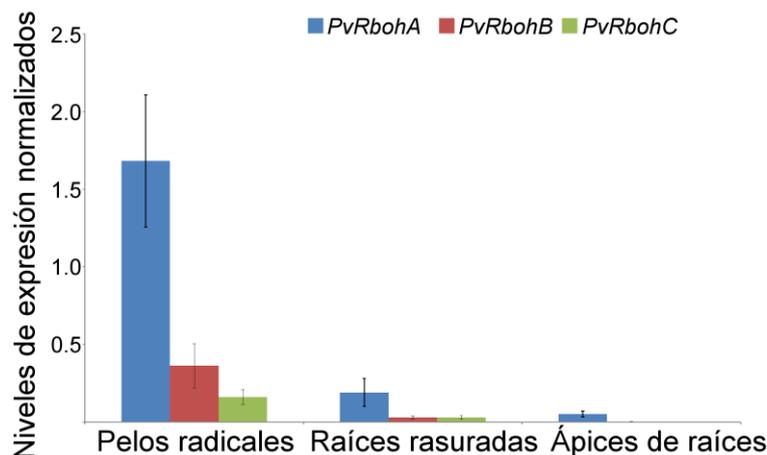


Figura 9. Perfil de expresión de las *PvRbohs* en diferentes órganos y tejidos de *P. vulgaris*. (a) Se determinó el patrón de expresión de cada *PvRboh* por RT-qPCR utilizando ARN total extraído de hojas, tallos, raíces y nódulos de 14 dpi con *R. tropici* CIAT899. (b) Abundancia relativa de transcrito de los genes *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC* mediante RT-qPCR a partir de ARN total extraído de pelos radicales, raíces rasuradas y ápices de raíces de plántulas de 2 dpg. Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia *EF1a*. Las barras representan \pm SEM (de las siglas standard error of the mean) de al menos tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas.

(b)



Como se mencionó anteriormente, los genes *PvRbohD-PvRbohI* se identificaron recientemente y por tal motivo, en los siguientes apartados de resultados, únicamente se analizaron los genes *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC*. Dado que la simbiosis rhizobia-leguminosa comienza en los pelos radicales de las leguminosas, se analizó la expresión relativa de *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC* por RT-qPCR en muestras de ARN aisladas de pelos radicales de plántulas de 2 días post-germinación (2 dpG) y se comparó con la expresión relativa de estos genes en ápices de raíces y raíces rasuradas de las mismas plántulas. Como se observa en la Figura 9b, los tres genes presentaron una gran acumulación de transcrito en los pelos radicales, sin embargo la mayor abundancia de transcrito corresponde al gen *PvRbohA*.

La abundancia de transcrito de los genes *PvRbohA-PvRbohC* varía en respuesta al tratamiento con FN y la inoculación con *Rhizobium*

Los factores de nodulación (FN) desencadenan en las raíces de las leguminosas muchas de las respuestas que son necesarias para que el proceso de nodulación se realice de forma satisfactoria (Cárdenas y Quinto, 2008). Por tal motivo, se analizó la expresión relativa de los genes *PvRbohA-PvRbohC* por RT-qPCR a partir de muestras de ARN extraídas de raíces de plántulas de *P. vulgaris* de 2 dpG a las 3, 6 y 12 hrs después del tratamiento con FN. Como se ilustra en la Figura 10, la abundancia de transcrito de los genes en estudio disminuyó a las 3hrs, al compararse con la expresión relativa de estos genes en las raíces control (raíces incubadas con el buffer en donde se disolvieron los FN y cosechadas a los mismos tiempos). Seis horas después de la percepción de los FN, la acumulación de los transcritos *PvRbohA-PvRbohC* fue similar a la detectada en las raíces control, sin embargo, a las 12 hrs, la expresión relativa de los tres genes aumentó ligeramente (Figura 10). Para obtener mayor información sobre la especificidad de esta respuesta, se analizó la abundancia de ARNm de los tres genes después del tratamiento con pentámeros de *N*-acetil glucosamina (Ps). Los Ps constituyen el esqueleto de los FN pero sin las modificaciones químicas que le confieren especificidad al proceso simbiótico. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con Ps no modifica de forma evidente el patrón de expresión de los genes *PvRbohA-PvRbohC* (Figura 10), lo cual sugiere que el perfil de expresión observado con FN es específico.

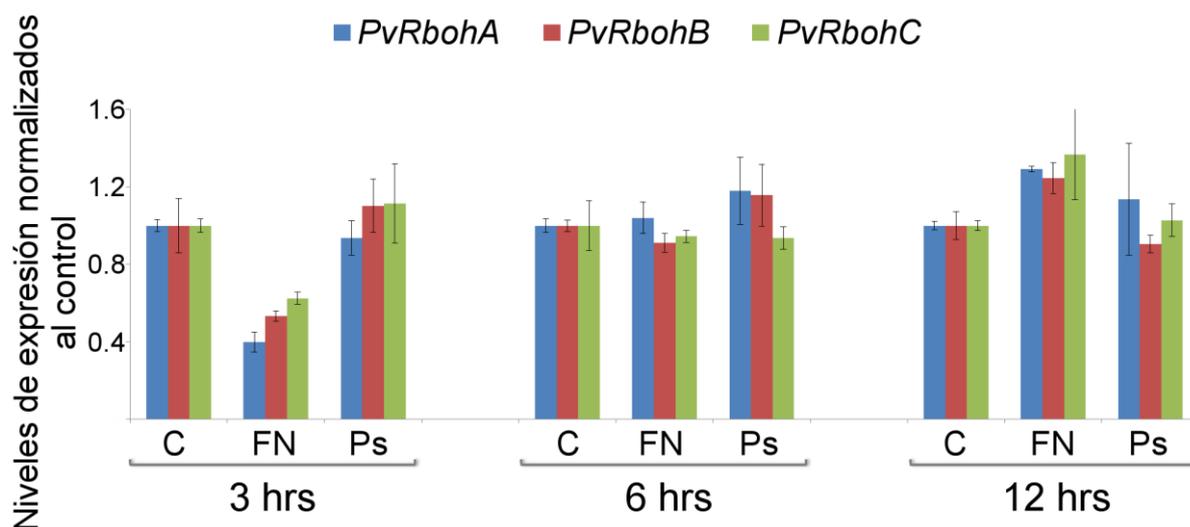


Figura 10. Patrón de expresión de *PvRbohA-PvRbohC* en respuesta al tratamiento con FN. Análisis del perfil de expresión relativa de *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC* por RT-qPCR a partir de muestras de ARN aisladas de raíces de *P. vulgaris*, 3, 6 y 12 hrs después del tratamiento con factores de nodulación (FN), pentámeros de *N*-acetil glucosamina (Ps) o el buffer donde se resuspendieron los FN (Control). La expresión relativa de las *PvRboh*s se normalizó con los valores de expresión del gen *EF1a* y se graficó con respecto a los valores de expresión relativa obtenidos en las raíces control, donde el valor 1, indica una expresión similar a la obtenida en las raíces control. Las barras representan \pm SEM de dos réplicas biológicas con tres repeticiones técnicas por réplica biológica.

Para conocer si la abundancia de transcrito de los genes *PvRbohA-PvRbohC* también presenta cambios en respuesta a la inoculación con *Rhizobium*, se analizó la expresión relativa de estos genes por RT-qPCR a etapas tempranas (3, 5 y 7 dpi) y tardías (14 y 21 dpi) del proceso de nodulación. Para descartar que los cambios detectados no se debieran a que la abundancia de los ARNm de los genes en estudio se encontrara modulada por la etapa de desarrollo de la planta, también se analizó la expresión de los genes en raíces de plantas de la misma edad y cosechadas a los mismos tiempos, pero sin haber sido inoculadas. Para los ensayos de RT-qPCR se utilizó como templado, ARN total extraído de la zona de nodulación de la corona de la raíz (zona susceptible a la infección por las rhizobia) de plantas control e inoculadas con *R. tropici* CIAT899. Los resultados mostraron que a los 3 y 5 dpi, la abundancia de ARNm de los tres genes fue similar a la detectada en raíces de plantas control (Figura 11a). Sin embargo, a los 7 dpi, la expresión relativa de los tres genes disminuyó en comparación con los valores detectados en las raíces de plantas control. En cuanto a las etapas tardías del proceso simbiótico, no se encontraron diferencias evidentes en la expresión relativa de los genes *PvRbohA-PvRbohC* entre las raíces control y las inoculadas con *Rhizobium* (Figura 11b). Como resultado de este análisis también se observó que la abundancia del ARNm del gen *PvRbohB* es hasta 30 veces mayor en raíces de plantas de 21 d con respecto a raíces de 3 d, lo cual sugiere que este gen podría participar en el desarrollo y/o crecimiento de las raíces de *P. vulgaris*.

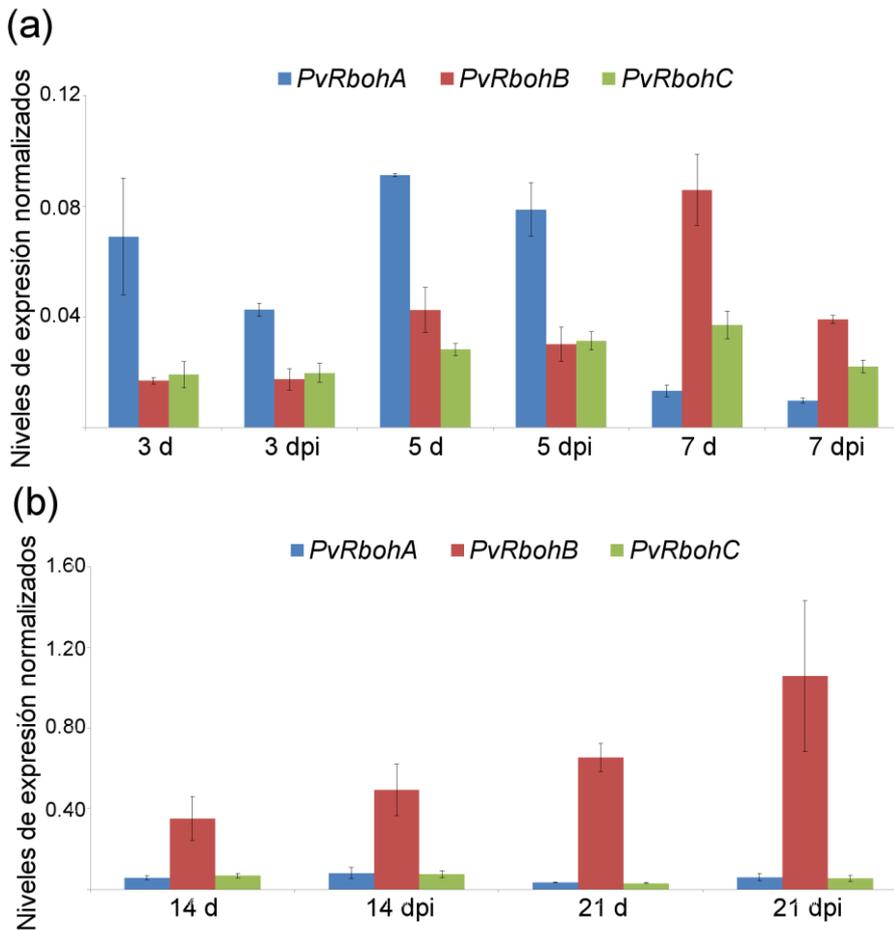


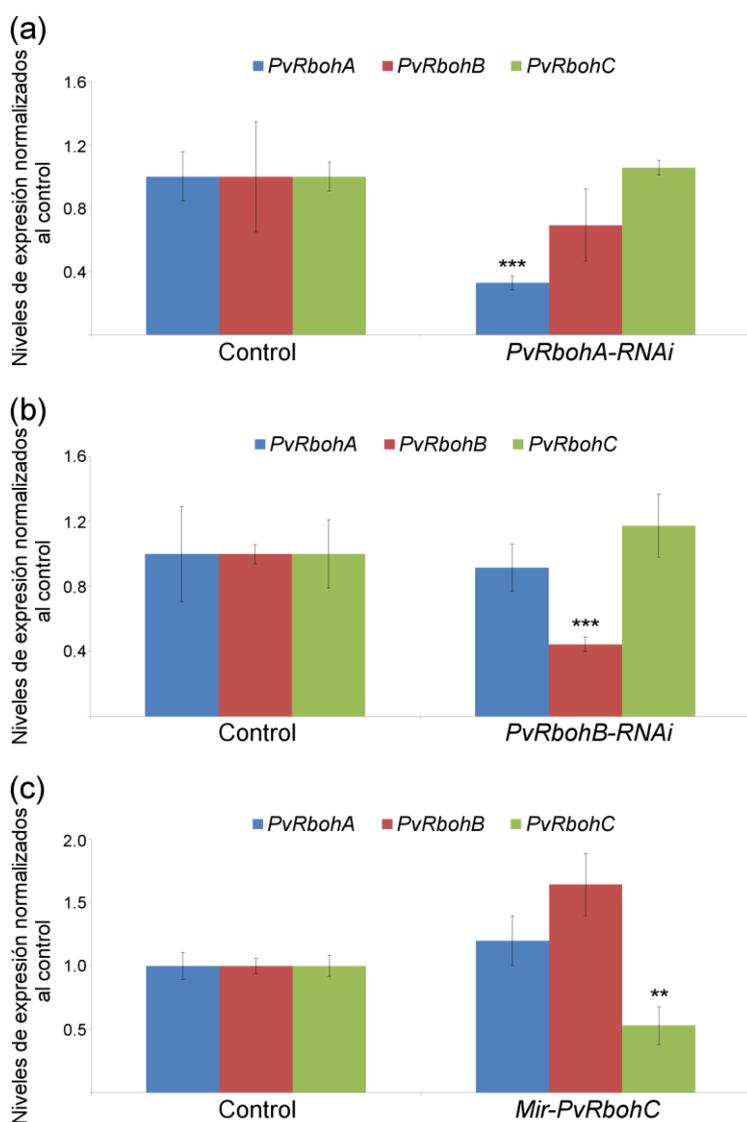
Figura 11. Expresión relativa de *PvRbohA-PvRbohC* durante la nodulación. La abundancia de ARNm de *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC* se evaluó por RT-qPCR en muestras de ARN aisladas de raíces de *P. vulgaris* a los 3, 5, 7 (a), 14 y 21 dpi (b) con *R. tropici* CIAT899. Como control, se analizó la expresión relativa de los genes en muestras de ARN de raíces de plantas de la misma edad no inoculadas. La abundancia de transcrito de la *PvRbohA-C* se normalizó con los valores de expresión del gen *EF1a*. Las barras representan el \pm SEM de al menos dos réplicas biológicas con tres repeticiones técnicas por réplica biológica.

El silenciamiento de los genes *PvRbohA* y *PvRbohB* reduce la nodulación

Como se mostró en los resultados obtenidos por RT-qPCR, los genes *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC*, se expresan en raíces, nódulos y pelos radicales de *P. vulgaris*, donde inicia la relación simbiótica con *Rhizobium*. Además, la abundancia de sus transcritos se modula en algunas ventanas de tiempo en respuesta al tratamiento con FN y la inoculación con *Rhizobium*. Para definir su papel en el proceso de nodulación se evaluó el efecto de la disminución de sus ARNm mediante genética reversa, en raíces transgénicas de *P. vulgaris* utilizando el sistema de plantas compuestas generadas por *A. rhizogenes* K599 (Estrada-Navarrete et al., 2007). Para silenciar de manera específica los genes *PvRbohA* y *PvRbohB*, se generaron construcciones de ARN interferente (ARNi) a partir de la región 3' UTR (untranslated region), la cual no se encuentra conservada entre las *PvRboh*s. Las secuencias diseñadas para generar el ARNi se introdujeron en el vehículo binario pTdT-DC-RNAi (Valdés-López et al., 2008), el cual permite la expresión del ARNi bajo la regulación del promotor constitutivo 35S. Además, este plásmido expresa *in planta* como marcador molecular la proteína roja fluorescente TdT (Niu et al., 2006). Como control, se utilizaron raíces transgénicas

transformadas con el vector pTdT-DC-RNAi que incluía una secuencia irrelevante y sin homología a alguna secuencia codificante en *P. vulgaris* (ver Metodología). Debido a que el silenciamiento de *PvRbohC* no fue exitoso con un ARNi, se diseñó un microARN artificial a partir de una región divergente con las demás *PvRbohs*.

Para corroborar la eficiencia y especificidad de las construcciones diseñadas para silenciar los genes *PvRbohA-PvRbohC*, se analizó la expresión relativa de los tres genes por RT-qPCR en muestras de ARN extraídas de raíces transgénicas de *P. vulgaris* de 10 días post-emergencia (dpe), las cuales estaban transformadas con las diferentes construcciones. Los datos obtenidos muestran que las raíces transgénicas transformadas con las construcciones *PvRbohA*-RNAi, *PvRbohB*-RNAi y Mir-*PvRbohC*, presentaron una reducción significativa en la abundancia de ARNm de los genes *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC*, respectivamente, en comparación con raíces transgénicas control (Figura 12a-c). Además, el silenciamiento fue específico, ya que la acumulación de ARNm de las otras *Rbohs* analizadas no disminuyó de manera significativa (Figura 12a-c).



Una vez verificada la eficiencia y especificidad de las diferentes construcciones, se evaluó el efecto de dicho silenciamiento en la simbiosis *P. vulgaris-Rhizobia* mediante ensayos de nodulación.

Figura 12. Expresión relativa de *PvRbohA-PvRbohC* para evaluar la especificidad y eficiencia de las construcciones de ARNi y microARN. Se determinó la abundancia de transcrito de los genes *PvRbohA* (barras negras), *PvRbohB* (barras grises) y *PvRbohC* (barras blancas) por RT-qPCR en muestras de ARN aisladas de *pools* de raíces transgénicas control y transformadas con las construcciones *PvRbohA*-RNAi (a), *PvRbohB*-RNAi (b) y Mir-*PvRbohC* (c). La expresión relativa se normalizó con el gen de referencia *EF1a* y se graficó con respecto a los niveles de expresión en las raíces control, donde el valor 1 indica una expresión similar al observado en las raíces control. Las barras representan \pm SEM de tres réplicas biológicas ($n > 5$ por réplica biológica) con tres repeticiones técnicas por réplica biológica. ** y *** valor de $P < 0.01$ y 0.001 , respectivamente (t , test).

Las plantas compuestas con las raíces transgénicas transformadas con las distintas construcciones se cultivaron en macetas con vermiculita, se inocularon con *R. tropici* CIAT899 y con la ayuda de un microscopio estereoscópico de epifluorescencia, se contabilizó el número de primordios de nódulos a los 5 dpi. Se encontró que en las raíces *PvRbohA*-RNAi y *PvRbohB*-RNAi, la formación de primordios de nódulos disminuyó drásticamente. El promedio de primordios de nódulos en 35 raíces *PvRbohA*-RNAi y 52 raíces *PvRbohB*-RNAi fue de 1.9 ± 0.6 ($n = 68$; donde \pm es SEM y n , el número total de primordios de nódulos o nódulos observados) y 1.1 ± 0.3 ($n = 59$), respectivamente; mientras que en 74 raíces transgénicas control el promedio fue de 5.6 ± 1 ($n = 415$) (Tabla V). Por el contrario, en las 48 raíces *Mir-PvRbohC* analizadas, el promedio de primordios de nódulos (4.8 ± 0.9 , $n = 234$) fue similar al detectado en las raíces control. Con el propósito de conocer si la reducción en la formación de primordios de nódulos en las raíces silenciadas en los genes *PvRbohA* y *PvRbohB* era debido a un retraso en el proceso de nodulación, se analizó la formación de nódulos a los 14 dpi. En esta etapa del proceso simbiótico la disminución en la formación de nódulos se mantuvo en la misma proporción en 53 raíces *PvRbohA*-RNAi y 31 raíces *PvRbohB*-RNAi. Las raíces silenciadas en el gen *PvRbohA* presentaron un promedio de 2.4 ± 0.5 nódulos ($n = 130$), mientras que para las raíces *PvRbohB*-RNAi el promedio fue de 2.9 ± 1 ($n = 90$). En contraste, en las raíces transgénicas control el promedio fue de 11.3 ± 1.7 nódulos ($n = 887$). Al igual que a los 5 dpi, en las 36 raíces *Mir-PvRbohC* que fueron analizadas, no se detectó un efecto significativo en su capacidad para nodular, en comparación con las raíces transgénicas control (Tabla V). Además, se analizó el porcentaje de las raíces transgénicas que presentaron diferentes grados de nodulación a los 5 y 14 dpi. Como se ilustra en la Figura 13a, a los 5 dpi más del 50% de las raíces *PvRbohA*-RNAi y *PvRbohB*-RNAi no nodularon, mientras que únicamente el 17% y el 7% de las raíces tuvieron más de 4 primordios de nódulos, respectivamente. Por el contrario, tanto en las raíces transgénicas control como en las raíces *Mir-PvRbohC*, más del 30% tuvieron más de 4 primordios de nódulos y el porcentaje de las raíces sin nódulos fue menor al 40%. Una tendencia similar se mantuvo a los 14 dpi, esto es, más del 70% de las raíces *PvRbohA*-RNAi y *PvRbohB*-RNAi presentaron menos de 5 nódulos, mientras que más del 50% de las raíces control y *Mir-PvRbohC* tuvieron más de 4 nódulos (Figura 13b). En su conjunto, estos resultados demuestran que la disminución en la abundancia de ARNm de los genes *PvRbohA* y *PvRbohB* por ensayos de genética reversa afecta evidentemente la nodulación en *P. vulgaris*. Por el contrario, el silenciamiento de *PvRbohC* no afectó de manera significativa la nodulación en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. Esto último podría deberse a que *PvRbohC* no tiene un papel significativo en la simbiosis o bien, que el nivel de silenciamiento no fue suficiente para tener un fenotipo. Además, también sugieren fuertemente que alguno de los eventos tempranos de la simbiosis *P. vulgaris*-

Rhizobium está afectado en las raíces *PvRbohA*-RNAi y *PvRbohB*-RNAi. En el presente trabajo nos enfocamos en analizar a las raíces *PvRbohB*-RNAi, sin embargo, en el laboratorio se ha continuado con el análisis de las raíces *PvRbohA*-RNAi utilizando los mismos enfoques que a continuación se describirán.

Tabla V. Ensayo de nodulación en raíces transgénicas de *P. vulgaris*

Construcción	5 dpi		14 dpi	
	Promedio de nódulos y/o primordios de nódulos	Raíces analizadas	Promedio de nódulos y/o primordios de nódulos	Raíces analizadas
Control	5.6±1.0	74	11.3±1.7	78
<i>PvRbohA</i> -RNAi	1.9±0.6 **	35	2.4±0.5***	53
<i>PvRbohB</i> -RNAi	1.1±0.3***	52	2.9±1.0***	31
Mir- <i>PvRbohC</i>	4.8±0.9	48	7.4±1.7	36

Número de nódulos y/o primordios de nódulos en raíces transgénicas cosechadas a los 5 y 14 dpi. ** y *** valor de P < 0.01 y 0.001 respectivamente (*t*, test comparado con el control).

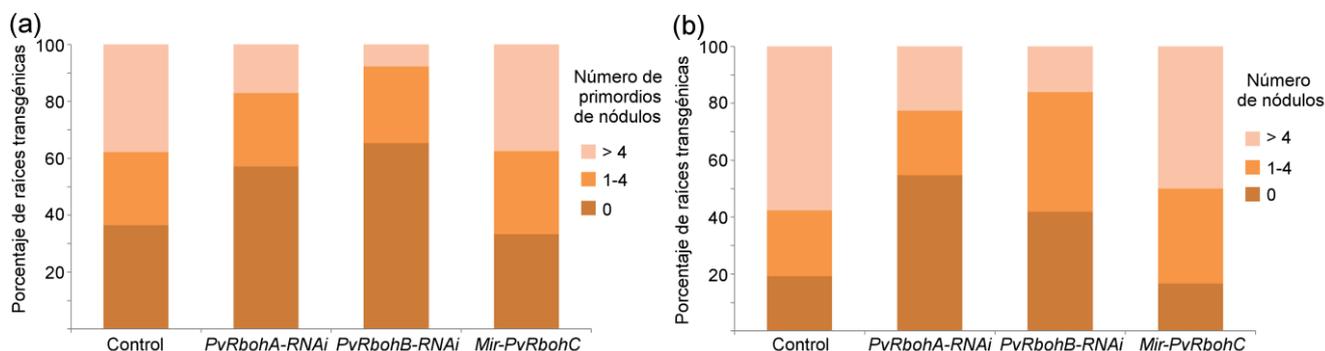


Figura 13. Grados de nodulación en las raíces transgénicas. Porcentaje de las raíces transgénicas control, *PvRbohA*-RNAi, *PvRbohB*-RNAi y Mir-*PvRbohC* con > 4, 1-4 y 0 primordios de nódulos/nódulos a los 5 dpi (a) y 14 dpi (b). El número de raíces analizadas a los 5 y 14 dpi se muestra en la Tabla V.

La progresión del hilo de infección (HI) se aborta en las raíces *PvRbohB*-RNAi

Para definir en que etapa simbiótica estaban afectadas las raíces *PvRbohB*-RNAi, éstas se inocularon con *R. etli*-GFP y el proceso de infección se monitoreó por microscopía confocal a los 5 dpi. Los eventos típicos de infección en pelos radicales enroscados se observaron tanto en raíces transgénicas control (Figura 14 a y b) como en las silenciadas en el gen *PvRbohB* (Figura 14 c y d). Sin embargo, mientras en las raíces transgénicas control se observaron hilos de infección (HI) ramificados y penetrando hacia las células corticales (Figura 14 e y f), en las raíces *PvRbohB*-RNAi, los HI estaban abortados en la base del pelo radical (Figura 14 g y h). Con el propósito de documentar este fenotipo cuantitativamente, el proceso de infección se examinó por microscopía óptica en raíces de 5 dpi con una cepa de *R. tropici* CIAT899 que expresa la β -glucuronidasa (*R. tropici*-GUS) (Vinuesa et al., 2002). De acuerdo al análisis estadístico que se realizó (*t*, test), el

número de eventos de infección por raíz transgénica fue equiparable entre las raíces transgénicas control y las silenciadas en el gen *PvRbohB* (Figura 15a). No obstante, mientras en las raíces transgénicas control el 38% de los HI invadieron las células corticales, en las raíces *PvRbohB*-RNAi únicamente el 8% (Figura 15b). Es importante destacar que el patrón de tinción de GUS en las raíces infectadas con *R. tropici*-GUS (Figura 15c-f) arrojó resultados similares a los colectados por microscopía confocal, esto es, la aborción de los HI en los pelos radicales de las raíces *PvRbohB*-RNAi (Figura 14).

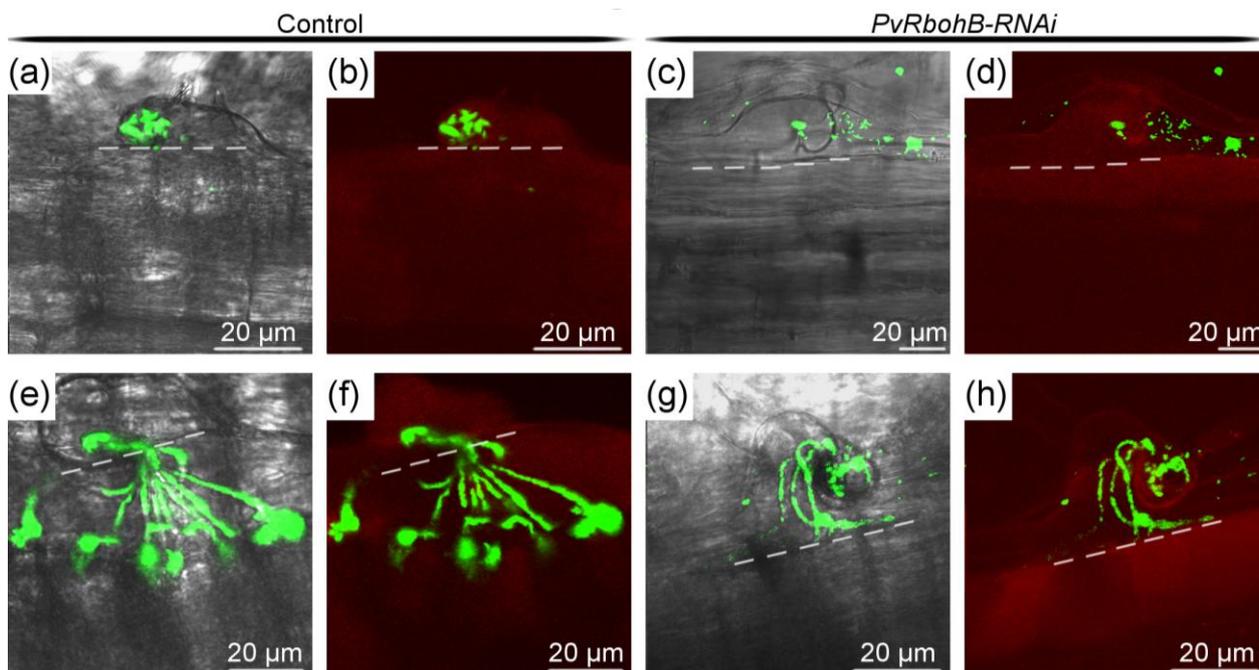


Figura 14. Visualización de la invasión de *Rhizobium* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* por microscopía de confocal. La entrada de *R. etli*-GFP se observa en pelos radicales enroscados de raíces transgénicas control (a y b) y *PvRbohB*-RNAi (c y d). Sin embargo, mientras en las raíces transgénicas control se detectaron HI atravesando la base del pelo radical e invadiendo las células corticales (e y f), en las raíces silenciadas en el gen *PvRbohB*, los HI se abortaron en la base del pelo radical (g y h). Las imágenes se adquirieron de raíces transgénicas de 5 dpi con *R. etli*-GFP por microscopía confocal. Imágenes de fluorescencia (b,d,f,h) y co-localización de la fluorescencia en campo verde con imágenes de luz transmitida (a,c,e,g). Las líneas punteadas indican la base del pelo radical.

Es importante resaltar que aún cuando los HI se abortaron en los pelos radicales de las raíces silenciadas en el gen *PvRbohB*, las raíces presentaron división mitótica en las células del córtex externo, lo cual es característico en las leguminosas que desarrollan nódulos determinados como *P. vulgaris* (Figura 15 c-f). Sin embargo, la actividad mitótica fue considerablemente menor en las raíces *PvRbohB*-RNAi (Figura 16b) que en las raíces transgénicas control (Figura 16a). Este defecto en el programa de desarrollo del nódulo podría explicar la reducción drástica en la formación de primordios de nódulos en las raíces silenciadas en el gen *PvRbohB*.

Esta idea está sustentada por los datos obtenidos del análisis de la expresión relativa de dos nodulinas tempranas (*Enod2* y *Enod40*), cuyos transcritos incrementan su abundancia durante la formación del primordio del nódulo (Oldroyd et al., 2011). La acumulación de los transcritos *Enod2*

y *Enod40* se incrementó de manera similar en las raíces transgénicas control y las raíces *PvRbohB*-RNAi a los 3 dpi (*R. etli*-GFP). No obstante, a los 7 dpi el incremento en la expresión relativa de las dos nodulinas tempranas analizadas, no se mantuvo en la misma proporción en las raíces silenciadas en el gen *PvRbohB* que, en las raíces transgénicas control (Figura 16c).

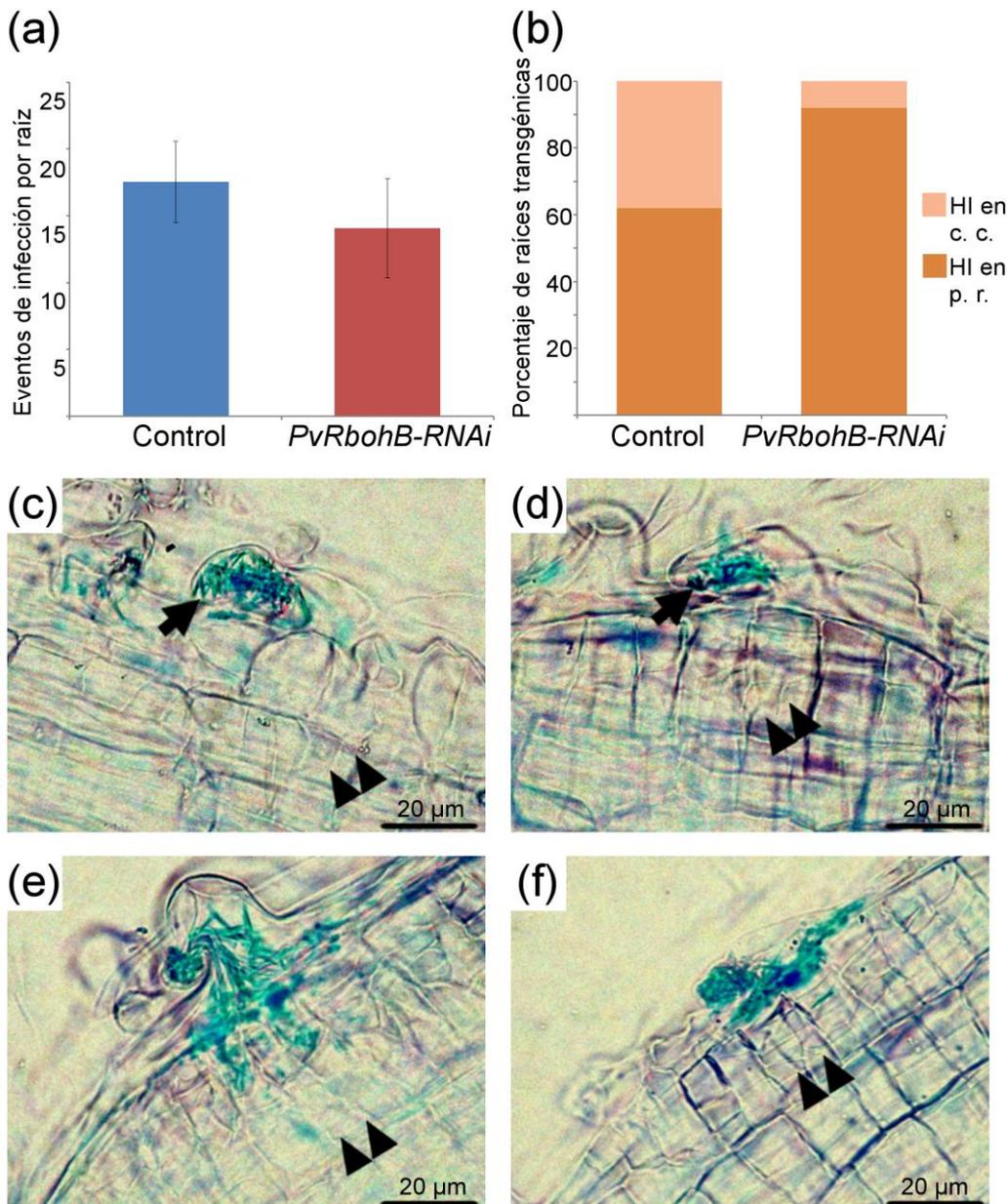


Figura 15. Análisis de los eventos de infección por tinción de GUS en raíces transgénicas control y *PvRbohB*-RNAi. (a) Gráfica del promedio de eventos de infección por raíz transgénica inoculada con *R. tropici*-GUS (5 dpi). (b) Porcentaje de HI que se observaron en los pelos radicales (p. r.) y en las células corticales (c. c.) La invasión de *R. tropici*-GUS está señalada con flechas en pelos radicales enroscados de raíces transgénicas control (c) y raíces *PvRbohB*-RNAi (d).

Imágenes representativas de HI avanzando hacia las células corticales de raíces transgénicas control (e) e HI abortados en raíces silenciadas en *PvRbohB* (f). Se analizaron los 3 cm iniciales de 15 raíces transgénicas control y 15 *PvRbohB*-RNAi por microscopía óptica. Barras representan \pm SEM. Las cabezas de flecha dobles señalan la división de células corticales.

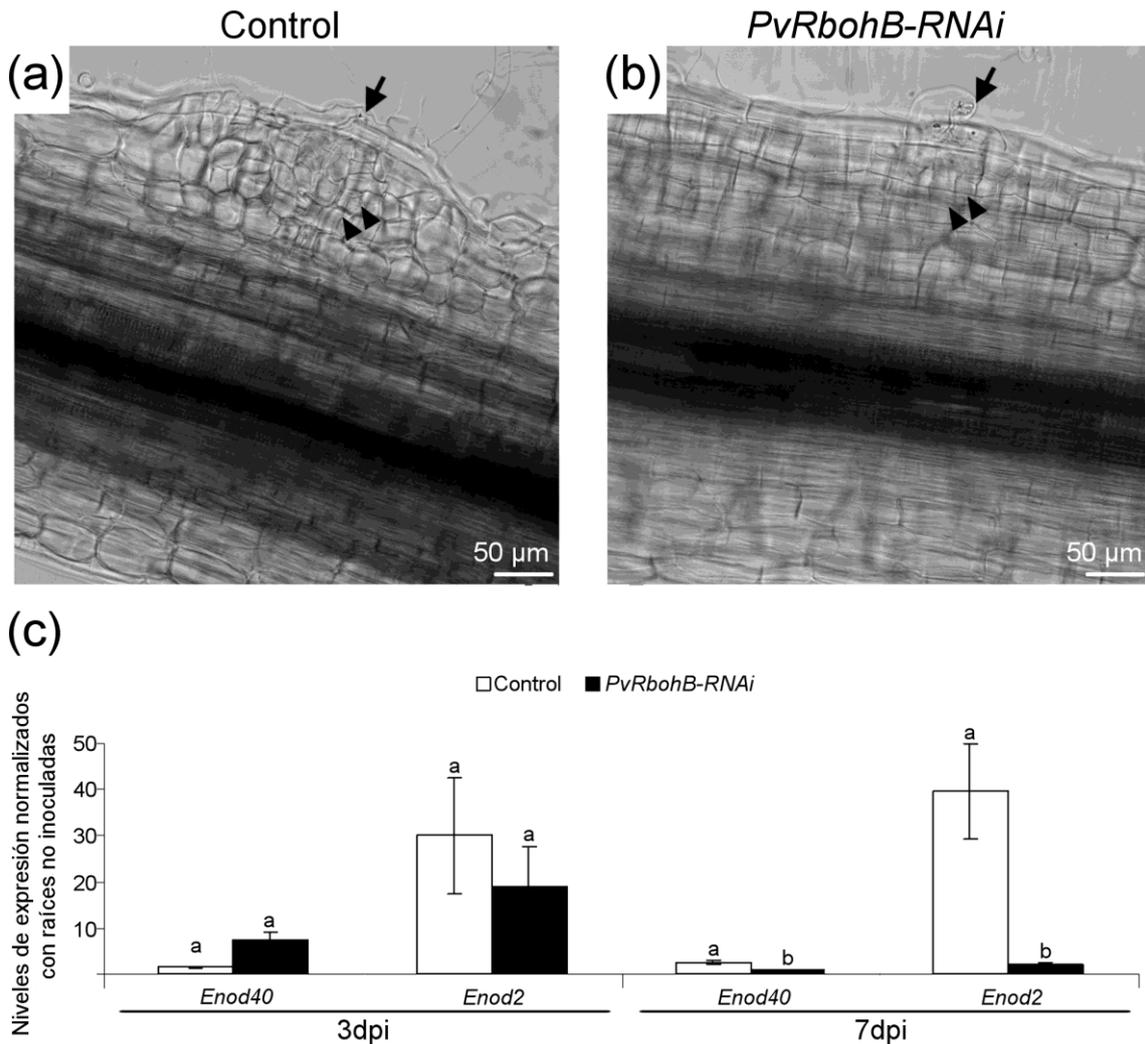


Figura 16. Análisis de la división de las células corticales y la expresión de las nodulinas tempranas *Enod2* y *Enod40* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* inoculadas con *Rhizobium*. Imágenes de microscopía óptica ilustran la división de las células corticales (cabezas de flecha dobles) en raíces transgénicas control (a) y *PvRbohB-RNAi* (b) a los 5 dpi con *R. tropici* CIAT899. Las flechas señalan los HI en los pelos radicales. (c) La abundancia de ARNm de los transcritos *Enod2* y *Enod40* se evaluó por RT-qPCR en muestras de ARN total extraído de raíces transgénicas control y *PvRbohB-RNAi* inoculadas con *R. etli-GFP* (3 y 7 dpi). Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia *EF1a* y se graficaron con respecto a los valores de expresión obtenidos en raíces transgénicas no inoculadas de la misma edad, donde el valor 1 indica una expresión similar a la detectada en las raíces transgénicas no inoculadas. Las barras representan \pm SEM de al menos dos replicas biológicas ($n > 5$ raíces transgénicas por réplica biológica). Letras diferentes indican un valor de $P < 0.05$ (t , test).

La acumulación de superóxido es menor en los primordios de nódulos de las raíces *PvRbohB-RNAi*

Diferentes grupos de trabajo han encontrado que los primordios de nódulos muestran gran acumulación del anión superóxido (Santos et al., 2001; Ramu et al., 2002), empleando un enfoque cualitativo con NBT. De manera similar, se encontró que los primordios de nódulos (5 a 7dpi con *R. tropici* CIAT899) de raíces transgénicas control de *P. vulgaris* presentan gran abundancia de

precipitados de NBT (Figura 17a). Con el propósito de conocer si las RBOHs participan en la generación de superóxido que se detectó en los primordios de nódulos de las raíces transgénicas control, éstos se incubaron durante 15 min con el inhibidor de flavo-enzimas DPI, antes del tratamiento con NBT. Como se ilustra en la Figura 17b, la acumulación de superóxido disminuyó notoriamente en los primordios de nódulos incubados con DPI y este dato refuerza la idea de que flavo-enzimas como las RBOHs tienen un papel significativo en la generación de superóxido en los primordios de nódulos de *P. vulgaris*. En los primordios de nódulos de las raíces *PvRbohB*-RNAi, la acumulación de los precipitados de NBT fueron visiblemente menores que en los primordios de nódulos de raíces transgénicas control (Figura 17c). Este resultado sugiere que *PvRBOHB* contribuye de manera importante con la generación de superóxido en los primordios de nódulos.

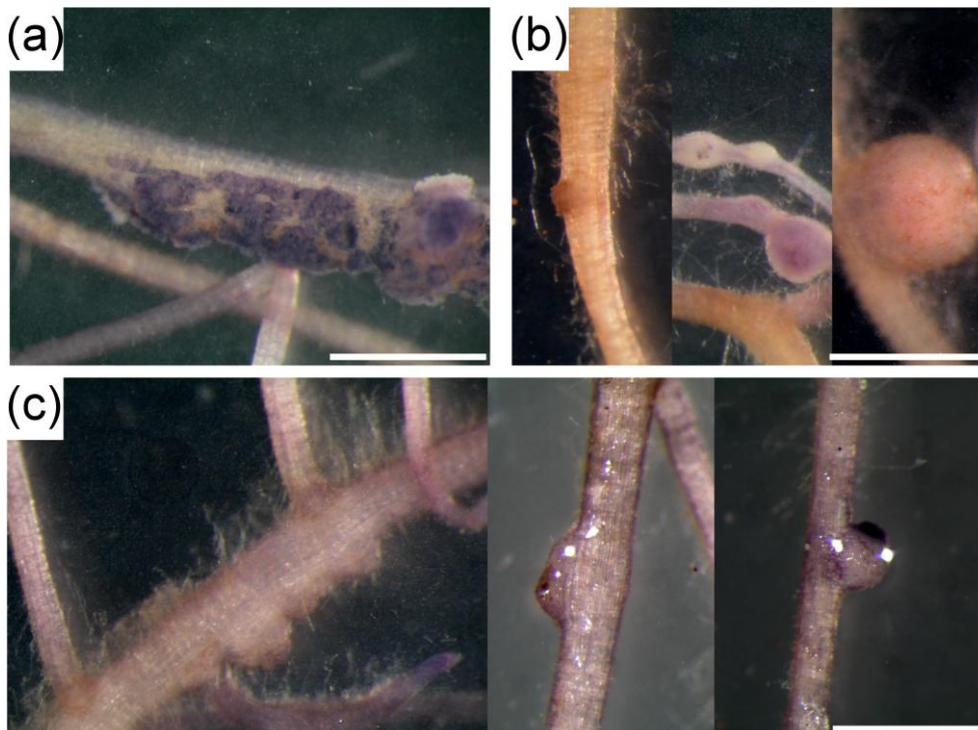


Figura 17. Acumulación de superóxido en primordios de nódulos de raíces transgénicas de *P. vulgaris*. Primordios de nódulos (5 a 7dpi con *R. tropici* CIAT899) de raíces transgénicas control (a y b) y *PvRbohB*-RNAi (c), se incubaron con NBT (0.1%) durante 10 minutos antes de su observación al microscopio. (b) Primordios de nódulos de raíces transgénicas control previamente incubadas con DPI (50μM durante 20 min). Imágenes representativas de > 10 raíces transgénicas analizadas por condición. Escala 1mm.

Para obtener mayor información sobre la generación de EORs en los primordios de nódulos de las raíces transgénicas de *P. vulgaris*, se evaluó la acumulación de H_2O_2 con la sonda fluorescente CM-H2DCFDA, la cual fue usada previamente en nuestro grupo de trabajo para analizar la generación de EORs en pelos radicales vivos de *P. vulgaris* (Cárdenas et al., 2008). A diferencia del anión superóxido, la mayor acumulación de H_2O_2 detectada con esta sonda fluorescente en los primordios de nódulos (5dpi con *R. tropici* CIAT899) de las raíces transgénicas control y raíces *PvRbohB*-RNAi se concentró en la región proximal a la raíz (Figura 18a y b). En nódulos jóvenes (7 dpi) también se encontraron niveles de fluorescencia altos en la región basal de

los nódulos y la ubicación de la señal fluorescente sugiere que corresponde a los haces vasculares (Figura 18c y d). Sin embargo, no se observaron diferencias evidentes en los niveles de intensidad de fluorescencia entre los primordios de nódulos y nódulos jóvenes de las raíces transgénicas control y las silenciadas en *PvRbohB* (Figura 18e). Estos resultados sugieren que el H₂O₂ se acumula preferentemente en los haces vasculares de los primordios de nódulos y nódulos jóvenes de *P. vulgaris* y que el silenciamiento de *PvRbohB* no afecta de manera evidente la acumulación del H₂O₂ en estas regiones.

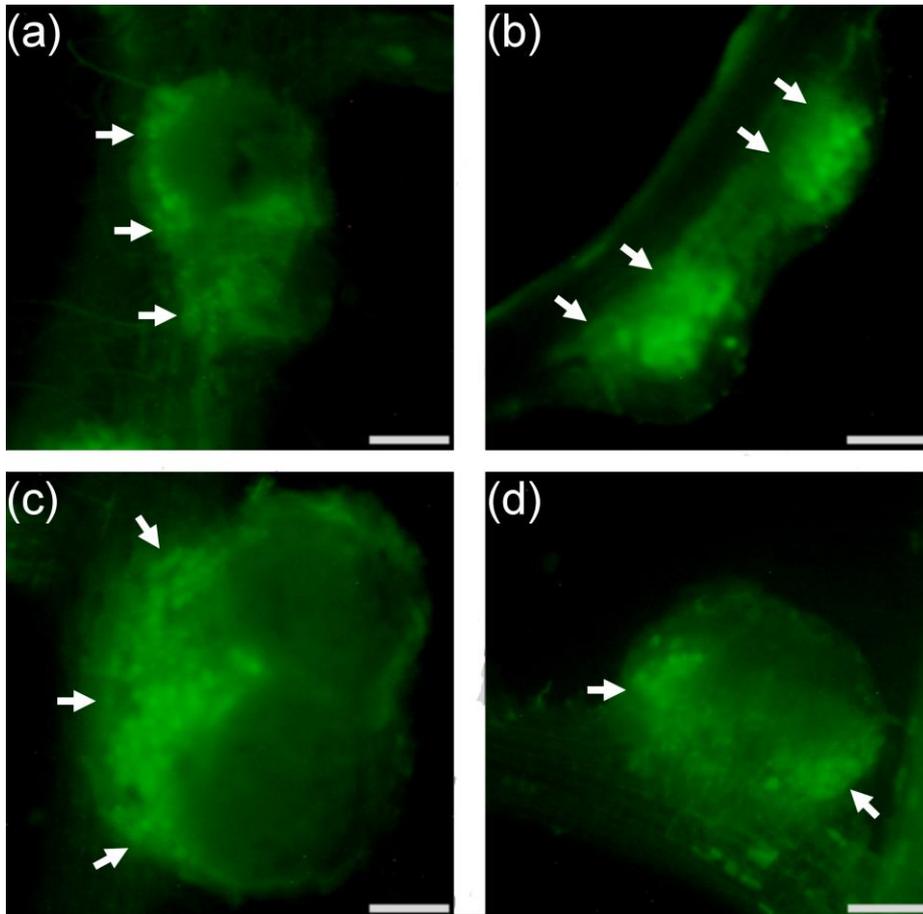
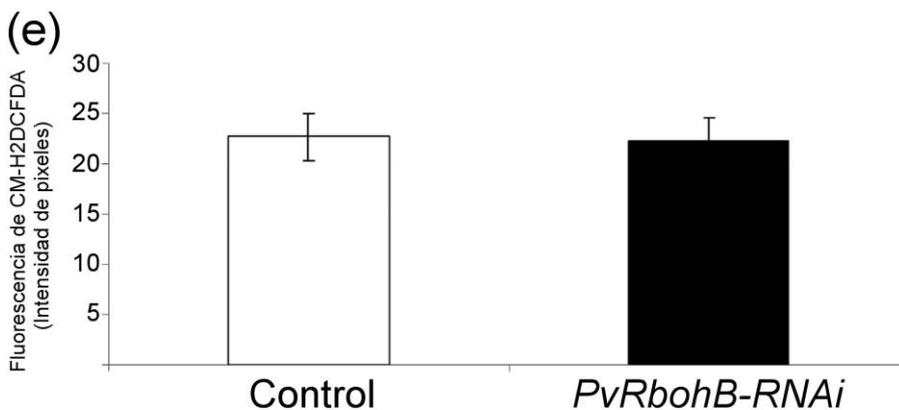


Figura 18. Producción de H₂O₂ en primordios de nódulos (5dpi) y nódulos jóvenes (7dpi) de raíces transgénicas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* CIAT899. Generación de H₂O₂ evaluada con CM-H2DCFDA (30-50μM) en primordios de nódulos (a y b) y nódulos jóvenes (c y d) de raíces transgénicas control (a y c) y *PvRbohB*-RNAi (b y d). Las flechas señalan la región de los primordios de nódulos y nódulos jóvenes con niveles de fluorescencia elevados. (e) Intensidad de la fluorescencia de CM-H2DCFDA en los primordios de nódulos y nódulos jóvenes mostrados en a-d. El análisis se realizó en áreas iguales de regiones equiparables. Imágenes representativas de > 10 raíces transgénicas control y *PvRbohB*-RNAi analizadas. Escala 200μm.



La estructura de los HI y los simbiosomas está afectada en los nódulos *PvRbohB*-RNAi

Los resultados colectados muestran que el silenciamiento del gen *PvRbohB* afecta la invasión de las rhizobia a través del HI y la formación del nódulo. No obstante, algunos eventos de infección culminaron en la formación de escasos nódulos. Por lo tanto, se analizó la histología de nódulos en desarrollo de tres réplicas biológicas. Se examinaron 13 nódulos colectados de 13 raíces transgénicas independientes cosechados a los 7, 14 y 21 dpi. Cortes histológicos del eje central de nódulos jóvenes (7dpi) mostraron que la organización celular fue similar entre nódulos control y *PvRbohB*-RNAi, aun cuando estos últimos mostraron menor tamaño (Figura 19a y b). Sin embargo, los HI de los nódulos *PvRbohB*-RNAi presentaron algunas anormalidades en comparación con los HI de nódulos control (Figura 19c). Los HI en los nódulos de las raíces silenciadas en el gen *PvRbohB* presentaron una forma irregular y fueron más anchos (Figura 19d). Para corroborar que este fenotipo se debía a la disminución en la abundancia de ARNm de *PvRbohB*, se realizaron ensayos de RT-qPCR a partir de muestras de ARN aisladas de una raíz transgénica control y una raíz *PvRbohB*-RNAi, donde se colectaron nódulos que presentaron el fenotipo descrito previamente. Como se ilustra en la Figura 19e, la acumulación del transcrito *PvRbohB* fue evidentemente menor en la raíz *PvRbohB*-RNAi en comparación con la detectada en la raíz transgénica control (Figura 19e). Este resultado sugiere que el fenotipo observado en los nódulos de las raíces *PvRbohB*-RNAi, se debe a una disminución en la abundancia del ARNm del gen *PvRbohB*.

Para obtener mayor información sobre la arquitectura de los HI en los escasos nódulos formados de las raíces *PvRbohB*-RNAi, se analizó su ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión. Los HI en los nódulos de las raíces transgénicas control fueron angostos, con poco material electrodensito alrededor de las bacterias y con una forma y tamaño regular (Figura 20a). En contraste, los HI de los nódulos *PvRbohB*-RNAi fueron más anchos, contenían una gran cantidad de material electrodensito alrededor de las bacterias y presentaron una estructura y tamaño irregular (Figura 20b y c). Otra observación importante concierne a la morfología de los simbiosomas en los nódulos *PvRbohB*-RNAi. Mientras los simbiosomas de nódulos control en la mayoría de los casos desarrollaron una morfología circular con un espacio del simbiosoma delgado (espacio entre el bacteroide y la membrana peribacteroidal), los simbiosomas de los nódulos *PvRbohB*-RNAi mostraron una estructura amorfa con un gran espacio del simbiosoma (Figura 20e,f,h-j).

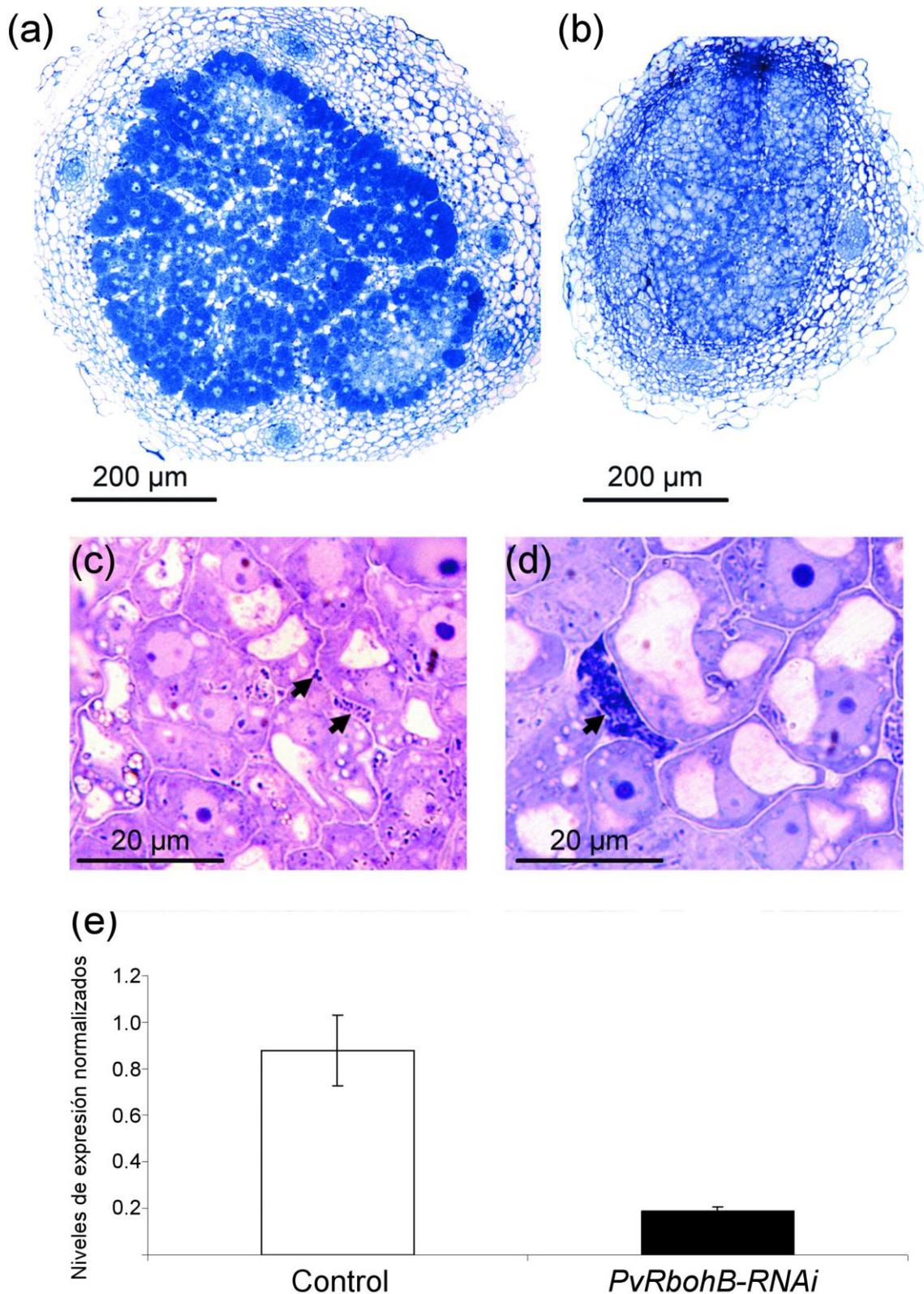


Figura 19. Análisis histológico y de la expresión relativa de *PvRbohB* en nódulos de raíces transgénicas. Las micrografías ilustran la morfología y organización celular de nódulos jóvenes (7 dpi con *R. etli*-GFP) representativos de raíces transgénicas control (a) y silenciadas en *PvRbohB* (b). La estructura de los HI se muestra en mayor detalle en nódulos de raíces transgénicas control (c) y *PvRbohB*-RNAi (d). Las flechas señalan los HI. (e), Expresión relativa de *PvRbohB* por RT-qPCR a partir de ARN aislado de una raíz transgénica control y una raíz silenciada en *PvRbohB* que presentaron los fenotipos arriba descritos. Los niveles de ARNm se normalizaron con el gen de referencia *EF1a*. Las barras representan \pm SD de tres réplicas técnicas.

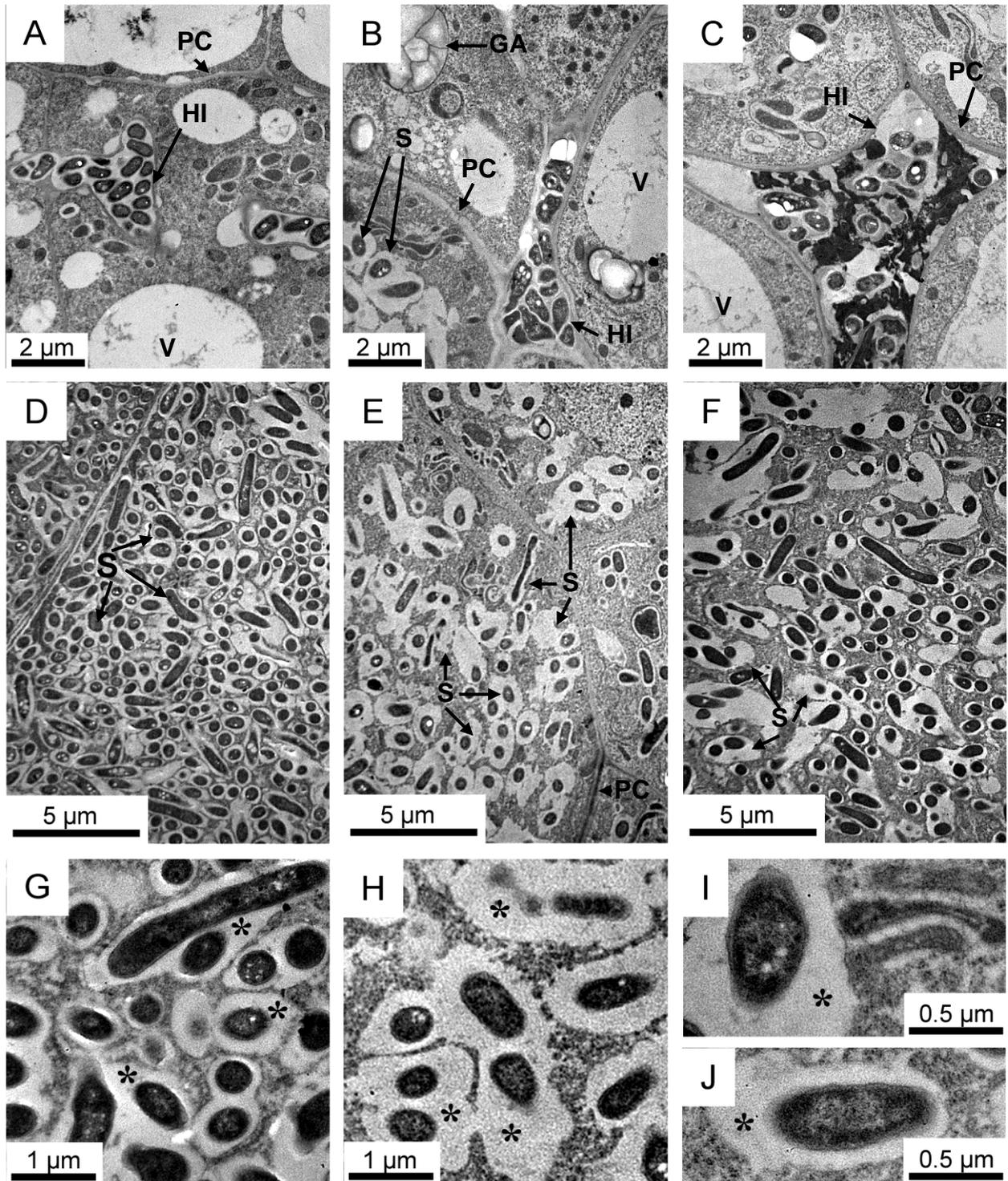


Figura 20. Ultraestructura de HI y simbiosomas de los escasos nódulos desarrollados en las raíces *PvRbohB*-RNAi. Imágenes de TEM ilustran la arquitectura representativa de HI (a-c) y simbiosomas (d-j) de un nódulo control (a,d,g) y dos nódulos *PvRbohB*-RNAi (b,c,e,f,h-j). PC, pared celular; HI, hilo de infección; S, simbiosoma; GA, gránulo de almidón; V, vacuola. El espacio del simbiosoma está indicado con asteriscos.

La fijación biológica del nitrógeno disminuye en los nódulos *PvRbohB*-RNAi

Los resultados anteriores demuestran que el silenciamiento de *PvRbohB* tiene consecuencias negativas en la morfología de los HI y simbiosomas de los escasos nódulos que se forman. Con el propósito de obtener información sobre el funcionamiento de esos pocos nódulos desarrollados en las raíces *PvRbohB*-RNAi, se evaluó la fijación biológica del nitrógeno mediante ensayos de reducción de acetileno en nódulos de 28 dpi con *R. tropici* CIAT899. Los resultados obtenidos muestran que la fijación biológica del nitrógeno por peso seco de nódulo fue 90% menor en los nódulos de las raíces silenciadas en *PvRbohB*, en comparación con nódulos de raíces transgénicas control (Tabla VI). Estos datos sugieren fuertemente que las diferentes afectaciones provocadas por el silenciamiento de *PvRbohB* tienen una repercusión negativa en la fijación biológica del nitrógeno en los pocos nódulos desarrollados.

Table VI. Actividad de nitrogenasa en nódulos transgénicos (28 dpi con *R. tropici* CIAT899) de *P. vulgaris*

Raíces transgénicas	Número de raíces transgénicas individuales analizadas	Reducción de Acetileno ($\mu\text{molC}_2\text{H}_2/\text{gPSN}/\text{hr}^{-1}$)
Control	5	56 (± 3.12 , SEM)
<i>PvRbohB</i> -RNAi	14	5.6 (± 5.6 , SEM)

Las raíces *PvRbohB*-RNAi presentan menor densidad de raíces laterales y producción de EORs

En *A. thaliana* se ha reportado que la longitud de la raíz primaria disminuye 20 y 35% en las líneas mutantes de los genes *AtRBOHC* y *AtRBOHD*, respectivamente (Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003). En las raíces transgénicas *PvRbohB*-RNAi (10 dpe), la longitud de la raíz principal disminuyó en 10%, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa comparada con la longitud de la raíz principal en las plantas transgénicas control (Figura 21a y b). Asimismo, se encontraron porcentajes similares de las raíces transgénicas control y *PvRbohB*-RNAi con una longitud de la raíz principal > 10, 5-10 y < 5cm (Figura 21c). Sin embargo, si hubo una reducción estadísticamente significativa en la densidad de raíces laterales (15%) en las raíces silenciadas en el gen *PvRbohB* con respecto a las raíces transgénicas control (Figura 21a y d). En el mismo sentido, más del 40% de las raíces *PvRbohB* tuvieron una densidad de raíces laterales menor a 5, mientras que en las raíces transgénicas control fue alrededor del 30% (Figura 21e). Este dato es de sumo interés ya que a la fecha no se tiene conocimiento sobre la participación de las RBOHs y en consecuencia de las EORs en el crecimiento y/o desarrollo de raíces laterales.

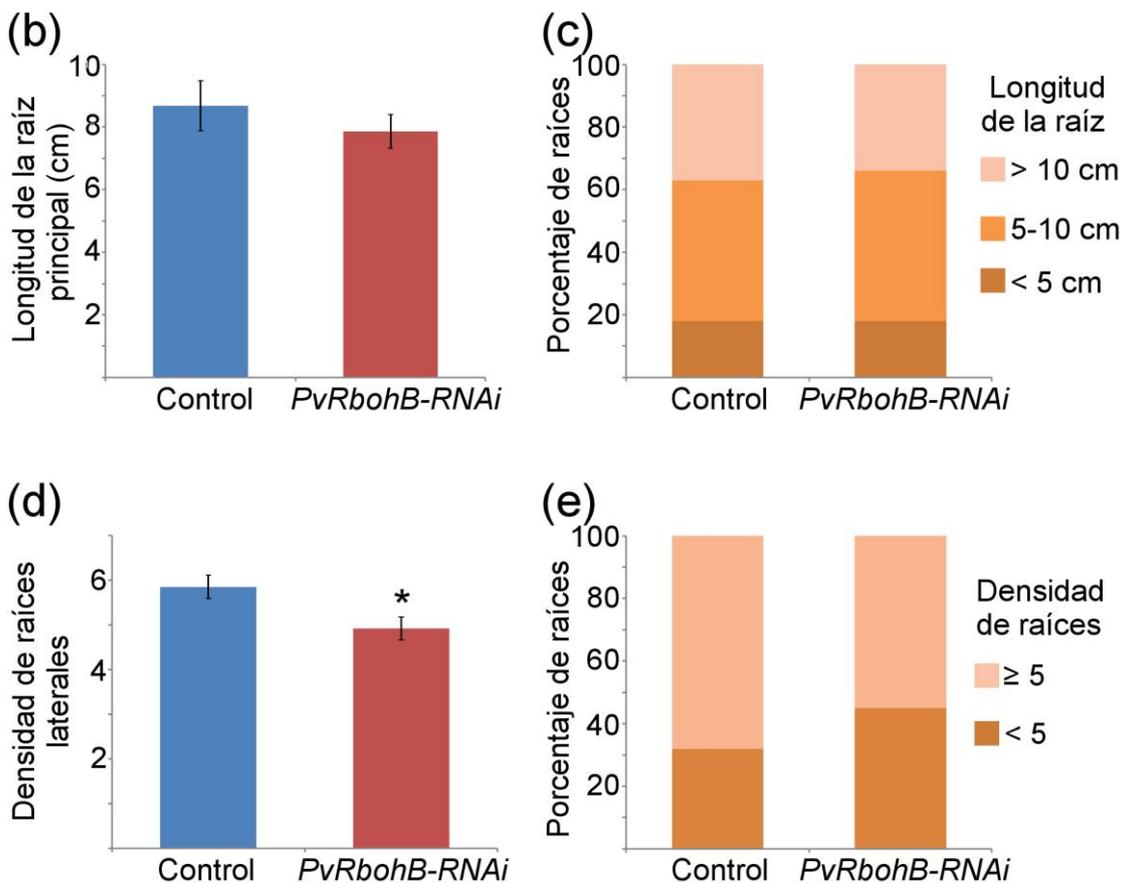
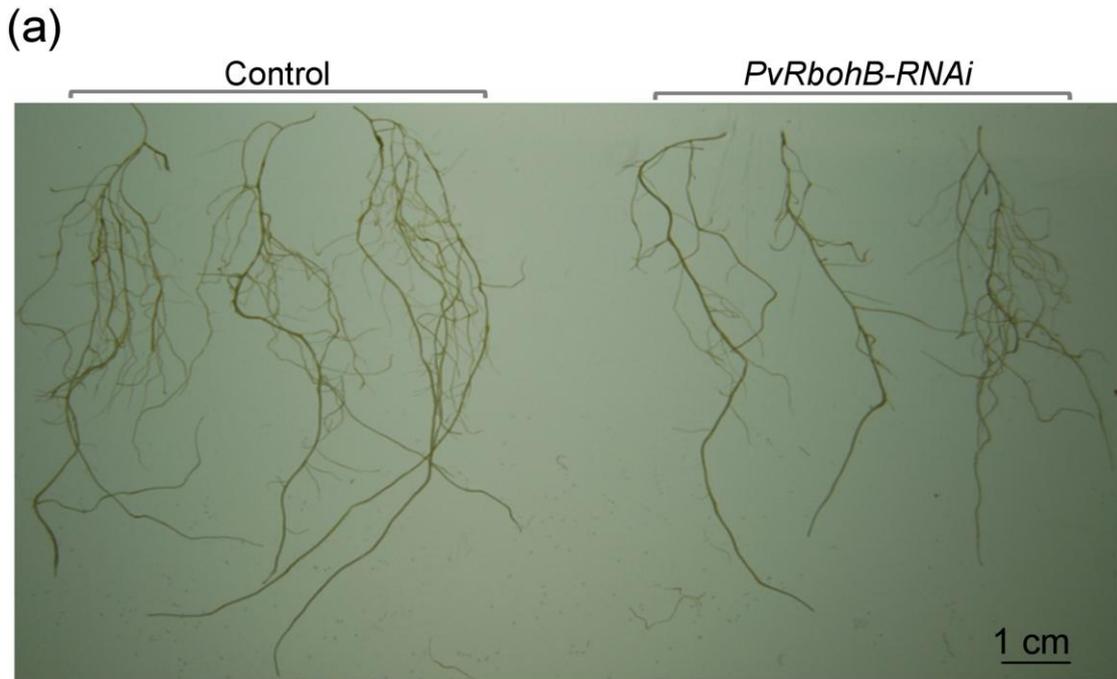


Figura 21. Fenotipo en las raíces del silenciamiento del gen *PvRbohB*. (a) Imagen representativa de tres raíces transgénicas control (izquierda) y tres raíces *PvRbohB*-RNAi (derecha) a los 10 dpe. Promedio de la longitud de la raíz principal (b) y porcentaje de las raíces transgénicas control y *PvRbohB*-RNAi con una longitud de la raíz principal > 10, 5-10 y < 5 cm (c). (d) Promedio de la densidad de raíces laterales y porcentaje de las raíces transgénicas control y *PvRbohB*-RNAi con densidad de raíces laterales < 5 y ≥ 5 (e). La longitud de la raíz principal y la densidad de raíces laterales se analizó en 23 raíces transgénicas control y 37 raíces *PvRbohB*-RNAi. El asterisco indica un valor de $P < 0.05$ (*t*, test).

Por otro lado, diferentes grupos de trabajo han demostrado que la mutación o el silenciamiento de *Rbohs* afecta la generación de EORs en los tejidos donde normalmente se expresan estas oxidasas (Suzuki et al., 2011). Por tal motivo, nos dimos a la tarea de analizar la generación de EORs en las raíces silenciadas en *PvRbohB* con las sondas NBT y CM-H2DCFDA. Como se ilustra en la Figura 22a, tanto en las raíces transgénicas control como en las raíces *PvRbohB*-RNAi, los precipitados de NBT se acumularon mayoritariamente en la región apical de las raíces. En cuanto al H₂O₂, detectado con el reactivo CM-H2DCFDA, éste no se encontró en la región apical como el anión superóxido, sino más bien en una región más arriba que correspondería a la zona de elongación (Figura 22b). Esta diferencia en el patrón de distribución del anión superóxido y el H₂O₂ también se ha descrito en raíces de *A. thaliana* (Dunand et al., 2007). Es importante hacer notar que tanto los precipitados de NBT como la fluorescencia emitida por CM-H2DCFDA fueron menores en las raíces *PvRbohB*-RNAi, con respecto a las raíces transgénicas control (Figura 22a y b). Esto último se corroboró al analizar los niveles de intensidad de fluorescencia (Figura 22c). En resumen, utilizando dos enfoques diferentes para evaluar los niveles de EORs, se encontró que las raíces silenciadas en *PvRbohB* presentan menor acumulación de EORs en comparación con las raíces transgénicas control.

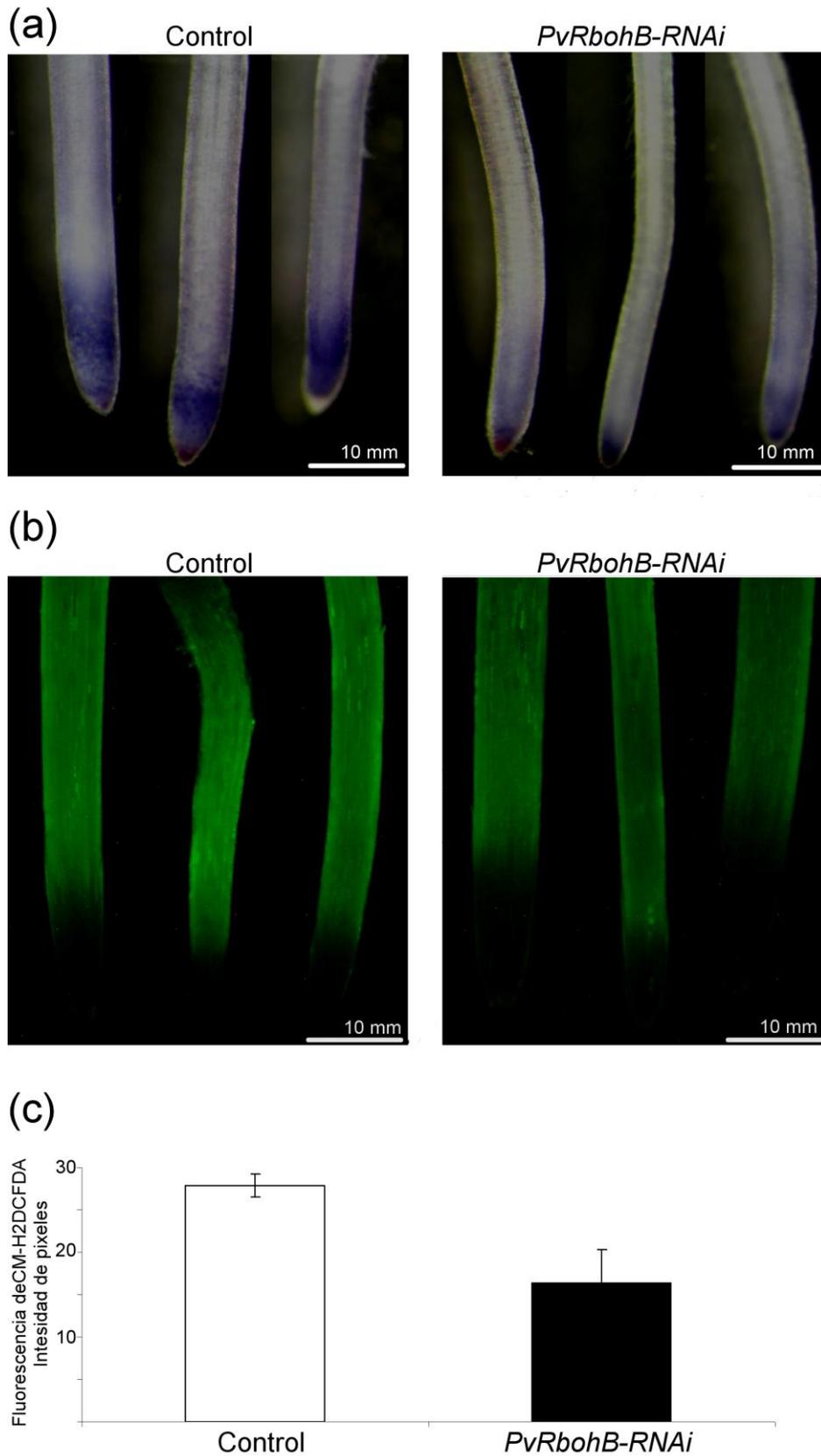


Figura 22. Análisis de la generación de EORs en raíces transgénicas de *P. vulgaris* de 10 dpe. (a) Acumulación de superóxido en tres raíces transgénicas control y tres raíces *PvRbohB-RNAi* utilizando NBT (0.1%). (b) Visualización de H_2O_2 en tres raíces transgénicas control y tres *PvRbohB-RNAi* con la sonda fluorescente CM-H2DCFDA (30-50 μ m). (c) Intensidad de la fluorescencia relativa de (b). El análisis se realizó en áreas iguales de regiones equiparables. Imágenes representativas de $n > 10$ raíces transgénicas.

DISCUSIÓN

La participación de las *Rbohs* en interacciones planta-microorganismo se ha enfocado principalmente, en el papel que desempeñan como reguladoras clave en mecanismos de defensa. En procesos simbióticos el único reporte que hay a la fecha es el descrito por Marino et al., (2011) en la simbiosis rhizobia-leguminosa. Estos autores describieron que *MtRbohA*, es necesaria para que la fijación de nitrógeno sea eficiente en nódulos de *M. truncatula*. En nuestro trabajo se analizó por ensayos de genética reversa el papel potencial de los genes *RbohA*, *RbohB* y *RbohC* de *P. vulgaris* en la simbiosis establecida con *Rhizobium*. Se encontró que la disminución en la abundancia de los transcritos de los genes *PvRbohA* y *PvRbohB* afecta drásticamente la formación de nódulos. Por el momento nuestro estudio se ha enfocado en caracterizar *PvRbohB* en el proceso de nodulación. Utilizando diferentes herramientas de microscopía, se encontró que *PvRbohB* desempeña un papel crucial en los HI, tanto en su progresión a través de los pelos radicales, como en su estructura dentro de los nódulos. El análisis filogenético que se realizó sugiere que *MtRBOHG* de *M. truncatula*, es la probable secuencia ortóloga de *PvRBOHB*. A pesar de que *MtRBOHG* no se ha caracterizado en el proceso de nodulación de *M. truncatula*, se sabe que su secuencia promotora es activa en la zona meristemática y de elongación en las raíces de *M. truncatula*, así como en los haces vasculares de nódulos de 21 dpi (Marino et al., 2011). El análisis *in silico* en el Medicago Gene Expression Atlas (Benedito et al., 2008), muestra que los genes *MtRbohE*, *MtRbohG*, *MtRbohB* y *MtRbohA*, probables ortólogos de *PvRbohA*, *B*, *C* y *D*, presentan expresión alta en hojas, tallos, raíces y nódulos, al igual que nosotros encontramos por RT-qPCR para los genes *PvRbohA-D*. Sin embargo, en estos órganos existen diferencias notorias en el perfil de expresión entre *PvRbohA-D* y sus probables secuencias ortólogas en *M. truncatula*. Esto sugiere que aun cuando de acuerdo al análisis filogenético podrían ser proteínas ortólogas, el patrón de expresión de estas oxidasas podría ser diferente en respuesta a estímulos bióticos entre estas dos leguminosas, como por ejemplo la simbiosis establecida con las rhizobia y por lo tanto podrían no ser proteínas ortólogas.

Los FN modifican la abundancia de transcrito de los genes *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC*

Durante las etapas iniciales de la simbiosis rhizobia-leguminosa, los niveles de EORs varían en las raíces de las leguminosas y estos cambios parecen ser específicos de la simbiosis, ya que éstos no se presentan cuando las plantas se inoculan con cepas mutantes de *Rhizobium* que no sintetizan FN (Bueno et al., 2001; Santos et al., 2001; Ramu et al., 2002; Shaw y Long, 2003; Lohar et al., 2007). En este sentido, en nuestro grupo de trabajo se encontró que los FN desencadenan en

los pelos radicales de *P. vulgaris* un incremento rápido y transitorio en la producción de EORs. Esta respuesta parecer ser específica de la simbiosis, ya que no se desencadena cuando las raíces son tratadas con pentámeros de *N*-acetyl glucosamina. Además, el incremento en la producción de EORs no se observa cuando las raíces son previamente incubadas con DPI (Cárdenas et al., 2008), lo cual sugiere que enzimas como las RBOHs podrían estar participando en dicha respuesta. En el presente trabajo se encontró mediante ensayos de RT-qPCR que la abundancia de ARNm de los genes *PvRbohA*, *PvRbohB* y *PvRbohC* disminuyó en las raíces de *P. vulgaris* 3 hrs después del tratamiento con FN. De manera similar Lohar et al., (2007) reportaron que la acumulación de los transcritos de *MtRboh2* y *MtRboh3* (probables ortólogos de *PvRbohA* y *PvRbohC*, respectivamente), desciende en las raíces de *M. truncatula*, 1 hr después del tratamiento con FN. Estos autores además encontraron que esta respuesta coincide temporalmente con una reducción en la generación de EORs en las raíces de *M. truncatula* así como también, con la hinchazón de los pelos radicales. Debido a que también observan la hinchazón de los pelos radicales 1 hr después del tratamiento con DPI, postulan que la disminución en la abundancia de transcrito de los genes *MtRboh2* y *MtRboh3* conlleva a una reducción en los niveles de EORs y que ésto es un pre-requisito para la hinchazón de los pelos radicales. Por lo tanto, es factible que un mecanismo similar ocurra en *P. vulgaris*, donde también sea necesario que la abundancia del ARNm de los genes *PvRbohA-PvRbohC* disminuya para que se reduzcan los niveles de EORs y se lleve a cabo la hinchazón de los pelos radicales después de percibir los FN. Por otra parte, es pertinente mencionar que las respuestas podrían ser diferentes entre estas dos leguminosas ya que los tiempos de respuestas son ligeramente diferentes.

PvRbohB* juega un papel crucial en la invasión de *Rhizobium

En este trabajo se demostró que el silenciamiento del gen *PvRbohB* disminuye la nodulación en un 90%, en comparación con raíces transgénicas control. Con la ayuda de herramientas de microscopía, se encontró que más del 90% de los HI se abortan en la base del pelo radical de las raíces *PvRbohB*-RNAi. Esta evidencia indica que la reducción en el número de nódulos se debe en gran medida a que los HI no progresaron hacia las células corticales, aunque la reducción en la densidad de raíces laterales (alrededor del 15%) también contribuiría con la menor cantidad de nódulos en las raíces silenciadas en *PvRbohB*. La presencia de HI abortados en la base del pelo radical se ha documentado previamente en diferentes leguminosas mutantes o silenciadas en algunos genes. A pesar de que no se han identificado los genes en algunas de estas mutantes (Tsyganov et al., 2002; Tansengco et al., 2003; Kuppusamy et al., 2004; Ooki et al., 2005; Lombardo et al., 2006; Yano et al., 2006; Marsh et al., 2007), entre los genes con función conocida

se encuentran un probable activador transcripcional RGP (Arrighi et al., 2008), una vapirina (Murray et al., 2011), una remorina (Lefebvre et al., 2010), factores de transcripción (Middleton et al., 2007; Asamizu et al., 2008; Zanetti et al., 2010), componentes del citoesqueleto (Yokota et al., 2009; Miyahara et al., 2010), proteínas involucradas en procesos de ubiquitinación (Shimomura et al., 2006; Kiss et al., 2009; Yano et al., 2009; Kang et al., 2011), flotilinas (Haney y Long, 2010) y receptores tipo cinasa (Catoira et al., 2001; Arrighi et al., 2006; Limpens et al., 2003; González-Rizzo et al., 2006; Murray et al., 2007) . Es importante destacar que una maquinaria génica similar también se requiere en otros procesos celulares, como el crecimiento polarizado de los pelos radicales (Ishida et al., 2008).

En pelos radicales de *A. thaliana* se ha propuesto que las EORs generadas por las RBOHs desempeñan un papel clave en su crecimiento polarizado, al modular la extensibilidad de la pared celular (Foreman et al., 2003; Monshausen et al., 2007; Takeda et al., 2008), por consiguiente es factible que un escenario similar se presente durante la progresión del HI en la simbiosis rhizobia-leguminosa. Tomando en cuenta los genes que son requeridos para la progresión del HI (Popp y Ott, 2011), es posible que parte de la maquinaria génica que se necesita para el crecimiento polarizado de los pelos radicales de las leguminosas, se reclute para el avance del HI. Esta idea está sustentada en el hecho de que el silenciamiento o mutación de algunos genes que afectan la progresión del HI, también tienen un efecto en el crecimiento de los pelos radicales (Oldroyd et al., 2011). Es importante recalcar que los HI en las raíces *PvRbohB*-RNAi pueden cruzar el pelo radical y llegar hasta su base, sin embargo no pueden atravesar hacia las células corticales en división. Al parecer, el paso de una célula a otra requiere de una serie de componentes, donde las EORs producidas por *PvRBOHB*, jugarían un papel decisivo. El hallazgo de que el silenciamiento del gen *PvRbohB* afecta la progresión del HI en el pelo radical, refuerza la idea de que las EORs juegan un papel clave en las etapas iniciales de la simbiosis rhizobia-leguminosa y por consecuencia, podemos añadir al gen *PvRbohB* a la lista de genes que son necesarios para la progresión del HI. Es probable que las EORs además de estar modulando la extensibilidad de la pared celular, también pudieran estar funcionando como moléculas señalizadoras, como se ha descrito ampliamente en diversos procesos en las células vegetales (Torres, 2010). Las EORs podrían estar modificando el estado redox de las células durante el proceso de infección y este desbalance podría estar activando o reprimiendo la actividad de distintas proteínas para que la simbiosis se realice de manera satisfactoria. En este contexto, se ha descrito que las EORs generadas por *AtRBOHD* pueden funcionar como moléculas señalizadoras durante la respuesta sistémica rápida en plantas de *A. thaliana* en respuesta a estreses abióticos (Miller et al., 2009). El papel señalizador de las EORs producidas por las NADPH oxidasas también se ha documentado con anterioridad en distintos

organismos de diferentes reinos como el protista, el fungi y el animal (Aguirre y Lambeth, 2010). Por ejemplo, Hansberg y Aguirre (1990) propusieron que un estado hiperoxidante conduce a la diferenciación celular en el hongo *Neurospora crassa*. Este estado hiperoxidante se caracteriza por una reducción en las actividades de enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, así como por un incremento en el contenido de proteínas carboniladas. Esta teoría se vio reforzada cuando se encontró que el anión superóxido se genera durante el desarrollo de los protoperitecios (estructuras sexuales femeninas) en *N. crassa* y que la cepa mutante *Δnox-1* no desarrolla protoperitecios (Cano et al., 2008).

Con estos datos sería de gran importancia analizar la generación de EORs durante estos eventos de infección en las raíces *PvRbohB*-RNAi. Desafortunadamente, con las sondas que contamos por el momento en nuestro grupo de trabajo para evaluar los niveles de EORs, aún no se ha podido sortear la dificultad técnica intrínseca a nuestro modelo de estudio, *P. vulgaris*. Como se mencionó anteriormente, los eventos de infección en las raíces de *P. vulgaris* ocurren en pelos radicales cortos, lo cual complica su análisis debido a la proximidad que se tiene con la raíz principal. Además, el hecho de que las raíces de *P. vulgaris* son más gruesas que las de otras leguminosas modelo como *L. japonicus* y *M. truncatula*, dificulta el análisis de estos eventos en raíces no clarificadas.

El silenciamiento de *PvRbohB* afecta el desarrollo de los primordios de nódulos

Al igual que en numerosas líneas de leguminosas mutantes o silenciadas en diversos genes (Popp y Ott, 2011), las raíces *PvRbohB*-RNAi presentaron divisiones de células corticales, a pesar de que el HI se abortaba en el pelo radical. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos la actividad mitótica no fue suficiente para dar lugar a la formación de un primordio de nódulo. Esto sugiere que *PvRbohB* es crucial tanto para el avance del HI, como para mantener la división mitótica en las células corticales que darán lugar a un primordio de nódulo. Esta idea es consistente con la elevada acumulación de superóxido que se ha detectado en primordios de nódulos de *M. truncatula* (Ramu et al., 2002) y con la que nosotros observamos en primordios de nódulos de raíces transgénicas control de *P. vulgaris*, la cual se redujo de manera evidente al incubarlos con el inhibidor DPI. Además, se encontró que los escasos primordios de nódulos que se formaron en las raíces *PvRbohB*-RNAi, también presentaron niveles de superóxido menores a los detectados en las raíces transgénicas control, lo cual apunta a que PvRBOHB participa en la generación de superóxido en el primordio del nódulo. La generación de superóxido podría requerirse en el crecimiento y/o desarrollo de los primordios de nódulos y por consiguiente, la disminución en la

generación de superóxido en los primordios de nódulos de las raíces *PvRbohB*-RNAi, podría explicar su menor tamaño y también la menor formación de éstos. Las EORs podrían estar jugando diferentes papeles durante el crecimiento y desarrollo de los nódulos. Por ejemplo, podrían estar modulando las propiedades de la pared celular tanto de los HI como de las células corticales en división. Además, no se puede descartar su rol como segundos mensajeros, al modificar la actividad de diferentes proteínas, entre éstas factores de transcripción que llevarían a la activación o represión de diferentes genes. Esta plurifuncionalidad de las EORs generadas por las NADPH oxidasas ya ha sido postulada y documentada en organismos modelo como *N. crassa*, *C. elegans* and *S. purpuratus*, entre otros (Aguirre y Lambeth, 2010).

Es importante hacer notar que mientras el anión superóxido (detectado con NBT) se observó en la superficie de todo el primordio del nódulo, la mayor acumulación de H₂O₂ visualizado con CM-H2DCFDA se encontró en una región que podría corresponder a los haces vasculares de los primordios de nódulos y nódulos jóvenes. Sin embargo, no podemos descartar que el anión superóxido también se produzca en los haces vasculares de los primordios de nódulos y nódulos jóvenes de *P. vulgaris*, ya que no se realizó una tinción para haces vasculares y la técnica empleada con NBT no permite clarificar el tejido sin perder la señal del NBT. La producción de H₂O₂ en tejido vascular también se ha descrito en tallos de *Zinnia elegans*, donde se observó que su acumulación co-localiza con eventos de lignificación (Olson y Varner, 1993). En este sistema también se ha sugerido que, al menos, una de las actividades responsables de la acumulación de H₂O₂ es la de la RBOH, dado que la generación de H₂O₂ disminuye drásticamente al incubar el tejido vascular de tallos de *Z. elegans* con inhibidores de las RBOHs como el DPI, imidazol, piridina y quinacrina (Ros Barceló, 1998). No obstante, el hecho de que las raíces *PvRbohB*-RNAi presentaron niveles de H₂O₂ similares a los detectados en las raíces transgénicas control indica que *PvRBOHB* no estaría contribuyendo de manera significativa con la producción de EORs en el tejido vascular del nódulo en desarrollo, o bien, que su ausencia podría ser compensada por otras enzimas.

Debido a que no se detectaron cambios evidentes en la abundancia de transcrito del gen *PvRbohB* durante las etapas de la nodulación cuando se forma el primordio del nódulo (3-7dpi) es factible proponer que esta oxidasa podría estar regulada a nivel post-transcripcional. Se ha documentado ampliamente que las RBOHs pueden ser reguladas en su extremo amino-terminal por: cambios en la concentración de calcio intracelular, proteínas cinasas dependientes de calcio, fosforilación y la unión de GTPasas pequeñas como las ROPs (racs of plants) (Kobayashi et al., 2007; Wong et al., 2007; Nakashima et al., 2008; Ogasawara et al., 2008; Takeda et al., 2008; Sirichandra et al., 2009). Evidencias recientes sugieren que este pudiera ser el caso, ya que el

silenciamiento de las GTPasas pequeñas *PvRack1* y *MtRac1*, disminuyen la nodulación en plantas de *P. vulgaris* y *M. truncatula*, respectivamente (Islas-Flores et al., 2011; Kiirika et al., 2012).

Los escasos nódulos de las raíces *PvRbohB*-RNAi presentan HI y simbiosomas anormales

El análisis histológico de los pocos nódulos que se desarrollaron en las raíces silenciadas en *PvRbohB* reveló que éstos presentan HI con formas irregulares y más anchos que los observados en los nódulos de raíces transgénicas control. La observación de estas muestras por microscopía de transmisión de electrones permitió identificar otras anormalidades en los nódulos *PvRbohB*-RNAi. Por ejemplo, la pared celular era más ancha y en la mayoría de los casos la matriz de los HI contenía una gran cantidad de material electrodensito que rodeaba a las bacterias. Un fenotipo parecido se reportó recientemente por Xie et al., (2012) en mutantes de *L. japonicus* en una pectato liasa (*Ljnpl-1* y *Ljnpl-2*). De igual forma, se ha descrito que en nódulos de *M. sativa* infectados con una cepa de *S. meliloti* que sobre-expresa el gen de la catalasa *KatB*, la matriz de los HI presentan menor acumulación de H₂O₂ y su estructura es anormalmente más ancha (Jamet et al., 2007). En nódulos de chícharo se ha encontrado que la acumulación de H₂O₂ en los HI se inhibe con DPI, lo cual sugiere que enzimas como las RBOHs, podrían estar participando en la producción de EORs en estas estructuras (Rubio et al., 2004). Estos resultados en su conjunto apuntan a que la dinámica de la pared celular juega un papel crucial en la estructura de los HI, donde las EORs serían elementos clave para que dicha dinámica se establezca. Asimismo, diversos reportes en la literatura han llevado a postular que las EORs son compuestos esenciales para el entrecruzamiento de los polímeros que forman la lignina y que este mecanismo permite el fortalecimiento de la pared celular en pelos radicales en crecimiento de *A. thaliana* (Knight, 2007). Es interesante que en otros sistemas biológicos tan distantes en la evolución a las plantas como son los nemátodos y los equinodermos, se ha descrito que las EORs generadas por la actividad de NADPH oxidasas, participan en el entrecruzamiento de proteínas de la matriz extracelular (Aguirre y Lambeth, 2010). Por tal motivo, también es posible que la generación de EORs por la actividad de *PvRBOHB* participe en modular la flexibilidad de la pared celular de los HI, y que por lo tanto, al verse disminuida la presencia de *PvRBOHB* en las raíces *PvRbohB*-RNAi, se desarrollan HI con una morfología alterada.

El análisis por TEM también permitió detectar que los simbiosomas que se formaron en los escasos nódulos *PvRbohB*-RNAi presentaban una estructura amorfa con un gran espacio del simbiosoma. Escenarios similares han sido descritos en las mutantes de *L. japonicus* *sen1* y *ign1* (Suganuma et al., 2003; Kumagai et al., 2007), así como en nódulos de *P. sativum* crecidos en

deficiencia de boro (Bolaños et al., 2001). La mutante *sen1* no ha sido caracterizada a la fecha (Suganuma et al., 2003), mientras que IGN1 codifica un proteína de membrana con repetidos de ankirina, cuya función en los simbiosomas aún se desconoce. Desafortunadamente, en la actualidad la información sobre los mecanismos moleculares que permiten el desarrollo de los simbiosomas es limitada, por tal motivo es difícil postular el papel que podría estar desempeñando PvrBOHB en dichas estructuras. Sin embargo, los cambios tanto en la morfología de los HI como en los simbiosomas de los nódulos *PvRbohB*-RNAi, permiten proponer que estas alteraciones son responsables de la disminución drástica en la fijación biológica del nitrógeno de los escasos nódulos silenciados en *PvRbohB*.

Por otro lado, cabe mencionar que a pesar de que los transcritos de los genes *PvRbohA*, *PvRbohC* y *PvRbohD* se acumulan de manera importante en los nódulos, parece que estos genes no compensan la disminución en la abundancia de ARNm del gen *PvRbohB*. Por lo tanto es posible que desempeñen funciones diferentes en los nódulos y/o que su expresión espacio-temporal sea distinta en los nódulos. Por ejemplo, *PvRbohD* podría ser necesario para que la fijación biológica se realice de forma satisfactoria, como lo hace *MtRbohA*, probable ortólogo en *M. truncatula* (Marino et al., 2011). También, cabe recordar que el silenciamiento de *PvRbohA* afecta en la misma proporción la nodulación, como lo hace el silenciamiento de *PvRbohB*. Es por ello, que en nuestro laboratorio se continúa con la caracterización de *PvRbohA*, de tal forma que podamos determinar en este caso, en que etapa del proceso simbiótico participa *PvRbohA*.

PvRbohB* participa en la generación de EORs en las raíces de *P. vulgaris

En los últimos años diversos grupos de trabajo han demostrado que las EORs desempeñan un papel clave en la regulación del crecimiento y desarrollo de las raíces (Swanson y Gilroy, 2010). En *A. thaliana* se ha demostrado que la desregulación en la expresión de genes implicados con el metabolismo de las EORs, no solo afecta los niveles de estos compuestos sino que también altera tanto la longitud de la raíz primaria como la proliferación celular (Tsukagoshi et al., 2010). En este sentido, la mutación de los genes de *A. thaliana* *AtRbohC* y *AtRbohD*, disminuye la longitud de la raíz primaria 20 y 35%, respectivamente, con respecto a plantas tipo silvestre (Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003). En el presente trabajo se encontró que el transcrito del gen *PvRbohB* aumenta con la etapa de desarrollo de la planta, siendo hasta 30 veces mayor en raíces de plantas de 21 días, con respecto a raíces de plantas de 3 días. Además, se observó que en las raíces *PvRbohB*-RNAi la reducción en los niveles del transcrito *PvRbohB* (alrededor del 50%), repercute en una disminución de aproximadamente 15% en la densidad de raíces laterales. Sin embargo, no se afectó de manera

significativa la longitud de la raíz principal. Tampoco se encontraron afectaciones en el crecimiento y desarrollo de los pelos radicales (datos no mostrados), lo cual no es sorprendente ya que el transcrito del gen *PvRbohA* fue el más abundante en pelos radicales de plántulas de 2dpg. Sería interesante explorar en el futuro si la mutación del gen *PvRbohB* tiene un efecto más drástico en el crecimiento de la raíz primaria, como se ha descrito en las mutantes *atrbohC* y *atrbohD* (Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003). Esto toma relevancia ya que también en las raíces de *A. thaliana* se ha observado gran acumulación de superóxido en la región meristemática y en la zona de elongación (Dunand et al., 2007). Además, el tratamiento con el inhibidor DPI, reduce la generación del anión superóxido en estas zonas de la raíz y también disminuye el crecimiento de la raíz primaria (Dunand et al., 2007). En el presente estudio se encontró que las raíces *PvRbohB*-RNAi, presentaban menor generación de EORs que las raíces transgénicas control, al evaluarse con dos enfoques diferentes para detectar EORs. En su conjunto estos resultados permiten sugerir que las EORs generadas por la actividad de PvRBOHB, podrían desempeñar una función importante en los mecanismos del crecimiento y/o desarrollo de las raíces de *P. vulgaris*. Por ejemplo, *PvRbohB* podría estar involucrado en algún proceso que lleve al crecimiento y/o desarrollo de las raíces laterales, ya que la densidad de raíces laterales disminuyó de manera significativa en las raíces *PvRbohB*-RNAi. Esta hipótesis abre un panorama interesante sobre la posible participación de las EORs y en concreto de las RBOHs, en el desarrollo y/o crecimiento de las raíces laterales, algo de lo que no se tienen reportes a la fecha.

En este trabajo se ha descrito por primera vez la participación de una *Rboh* en el establecimiento de un proceso simbiótico. Los resultados obtenidos demuestran que *PvRbohB* juega un papel esencial en el HI, tanto en etapas iniciales como tardías del proceso de nodulación. Esta oxidasa también desempeña alguna función importante en los simbiosomas, así como en el crecimiento y/o desarrollo de raíces laterales. Estas conclusiones se han fortalecido, ya que recientemente en el grupo de trabajo se ha observado actividad del promotor del gen *PvRbohB* durante la formación del HI y el desarrollo del nódulo, así como durante la emergencia de las raíces laterales.

CONCLUSIONES

- Las *Rbohs* forman una familia génica de nueve miembros en *P. vulgaris*.
- Las *PvRbohs* presentan expresión diferencial en distintos órganos de *P. vulgaris*.
- La abundancia de transcrito de los genes *PvRbohA*, *B* y *C* presenta cambios en respuesta al tratamiento con factores de nodulación y la inoculación con *Rhizobium*.
- El silenciamiento específico de *PvRbohA* y *PvRbohB* disminuye la nodulación en raíces transgénicas de *P. vulgaris*.
- La reducción en el número de nódulos en las raíces silenciadas en *PvRbohB*, se debe en gran medida a que la progresión del hilo de infección se aborta en los pelos radicales y a que no se mantiene la división mitótica en las células corticales.
- Los pocos primordios de nódulos que se desarrollan en las raíces silenciadas en *PvRbohB* presentan menor acumulación del anión superóxido.
- Los escasos nódulos que se forman en las raíces silenciadas en *PvRbohB* desarrollan hilos de infección amorfos y anchos, así como simbiosomas con un espacio del simbiosoma más amplio.
- La fijación biológica del nitrógeno está drásticamente reducida en los nódulos de las raíces silenciadas en *PvRbohB*.
- Las raíces silenciadas en *PvRbohB* presentan menor acumulación de EORs y menor densidad de raíces laterales. Esto último también contribuiría con la disminución en el número de nódulos.

PERSPECTIVAS

- Continuar con la caracterización del gen *PvRbohB*:
 - Monitorear la actividad promotora de *PvRbohB* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* así como durante el proceso de nodulación, mediante la fusión transcripcional de la región promotora de *PvRbohB* a la secuencia de marcadores moleculares como son la proteína verde fluorescente y la beta glucuronidasa.
 - Determinar la localización de PvRBOHB en las raíces de *P. vulgaris* y durante el proceso de nodulación. Para ello podrían generarse raíces transgénicas de *P. vulgaris* que expresen la proteína PvRBOHB fusionada a una proteína fluorescente, bajo el control transcripcional del promotor nativo. También se podrían generar anticuerpos específicos contra PvRBOHB, para llevar a cabo su inmunolocalización.
 - Evaluar los niveles de EORs durante el proceso de nodulación en las raíces silenciadas en *PvRbohB*, utilizando la proteína detectora de peróxido de hidrógeno Hyper. Para ello se generarían raíces transgénicas de *P. vulgaris* que co-expresaran la sonda Hyper y la construcción *PvRbohB*-RNAi. Esta estrategia nos permitiría monitorear los niveles de peróxido de hidrógeno de una forma menos estresante para el tejido.
 - Evaluar el fenotipo del silenciamiento de *PvRbohB* en el proceso de micorrización.
 - Analizar el efecto de sobre-expresar este gen en el proceso de nodulación y micorrización.
- Continuar con la caracterización del gen *PvRbohA*, ya que como se demostró en el apartado de resultados, su silenciamiento por ARNi también tiene un efecto negativo en la simbiosis *P. vulgaris*-*Rhizobium*. La caracterización consistiría en un análisis similar al que se realizó para las raíces *PvRbohB*-RNAi junto con las perspectivas que se plantearon previamente para *PvRbohB*.
- Generar raíces transgénicas de *P. vulgaris* co-silenciadas en *PvRbohA* y *PvRbohB* y evaluar su efecto en el crecimiento de la raíz, la simbiosis con *Rhizobium* y con *Glomus intraradices*.

LITERATURA CITADA

- Aguirre J, Lambeth JD** (2010) Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radical Biology & Medicine* **49**: 1342-1353
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Plant Biology* **55**: 373-399
- Arrighi JF, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet EP, Gherardi M, Huguet T, Geurts R, Denarie J, Rouge P, Gough C** (2006) The *Medicago truncatula* lysin-motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* **142**: 265-279
- Arrighi JF, Godfroy O, De Billy F, Saurat O, Jauneau A, Gough C** (2008) The *RPG* gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 9817-9822
- Asada K**, (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* **141**: 391-396
- Asamizu E, Shimoda Y, Kouchi H, Tabata S, Sato S** (2008) A positive regulatory role for LjERF1 in the nodulation process is revealed by systematic analysis of nodule-associated transcription factors of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **147**: 2030-2040
- Bedard K, Lardy B, Krause KH** (2007) NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie* **89**: 1107-1112
- Becana M, Matamoros MA, Udvardi M, Dalton DA** (2010) Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytol* **188**: 960-976
- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK** (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **55**: 504-513
- Blanco FA, Meschini EP, Zanetti ME, Aguilar OM** (2009) A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-Rhizobium symbiotic association. *Plant Cell* **21**: 2797-2810
- Bolaños L, Cebrián A, Redondo-Nieto M, Rivilla R, Bonilla I** (2001) Lectin-like glycoprotein PsNLEC-1 is not correctly glycosylated and targeted in boron-deficient pea nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 663-670
- Bueno P, Soto MJ, Rodríguez-Rosales MP, Sanjuan J, Olivares J, Donaire JP** (2001) Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of Rhizobium-legume symbiosis. *New Phytol* **152**: 91-96

Cano-Domínguez N, Álvarez-Delfín K, Hansberg W, Aguirre J (2008) NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa* Eukaryotic Cell **7**: 1352-1361

Cárdenas L, Vidali L, Domínguez J, Pérez H, Sánchez F, Hepler PK, Quinto C (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. Plant Physiol **116**: 871-877

Cárdenas L, Feijó AJ, Kunkel GJ, Sánchez F, Holdaway C, Hepler KP, Quinto C (1999) *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. Plant J **19**: 347-352

Cárdenas L, Terena L, Holdaway-Clarke, Sánchez F, Quinto C, Feijó JA, Kunkel GJ, Hepler KP (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. Update on Plant Signalling. Plant Physiol **123**: 443-451

Cárdenas L, Martínez A, Sánchez F, Quinto C (2008) Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). Plant J **56**: 802-813

Cárdenas L, Quinto C (2008) Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors. Plant Signal Behav **3**: 1101-1102

Catoira R, Timmers AC, Maillet F, Galera C, Penmetsa RV, Cook D, Denarie J, Gough C (2001) The HCL gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling. Development **128**: 1507-1518

Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. Plant Physiol **141**: 330-335

De Ruijter NCA, Bisseling T, Emons AMC (1999) *Rhizobium* Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. Mol Plant-Microbe Interact **12**: 829-832

D'Haese W, De Rycke R, Mathis R, Goormachtig S, Pagnotta S, Verplancke C, Capoen W, Holsters M (2003) Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. Proc Natl Acad Sci USA **100**: 11789-11794

Dos Santos VC, Rey P (2006) Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. TRENDS in Plant Science **11**: 329-334

Dubrovsky JG, Gambetta GA, Hernández-Barrera A, Shishkova S, Gonzalez I (2006) Lateral root initiation in Arabidopsis: developmental window, spatial patterning, density and predictability. Ann Bot **97**: 903-915

Dunand C, Crevecoeur M, Penel C (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. New Phytol **174**: 332-341

- Ehrhardt WD, Atkinson ME, Long RS** (1992) Depolarization of Alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**: 998-1000.
- Ehrhardt WD, Wais R, Long RS** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**: 673-681
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillén G, Díaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sánchez F** (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Protoc* **2**: 1819-1824
- Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M** (1996) Rapid alkalinization in alfalfa roots in response to rhizobium lipoquitoligosaccharides signals. *Plant J* **10**: 295-301
- Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, Schultze M** (1998) The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J* **13**: 455-463
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446
- Fridovich I** (1997) Superoxide anion radicals (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* **272**: 18515-18517
- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300
- González-Rizzo S, Crespi M, Frugier F** (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* **18**: 2680-2693
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayer RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS** (2012) Phytozome: a comparative platform for green plants genomics. *Nucleic Acids Res (D1)*: D1178-D1186
- Geurts R, Bisseling T** (2002) *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell* **14**: S239-S249
- Haney CH, Long SR** (2010) Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 478-483
- Hansberg W, Aguirre J** (1990) Hyperoxidant state cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* **142**: 201-221.
- Hansberg W** (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje bioquímico volumen XXVI. Departamento de bioquímica, Facultad de Medicina UNAM
- Hao F, Wang X, Chen J** (2006) Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Science* **170**: 151-158

- Heo J, Campbell LS** (2006) Ras regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Biochemistry* **45**: 2200-2210
- Ishida T, Kurata T, Okada K, Wada T** (2008) A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 365-386
- Islas-Flores T, Guillén G, Alvarado-Affantranger X, Lara-Flores M, Sánchez F, Villanueva MA** (2011) PvRACK1 loss-of-function impairs cell expansion and morphogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 819-826
- Jamet A, Mandon K, Puppo A, Herouart D** (2007) H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J Bacteriol* **189**: 8741-8745
- Jang IC, Wook S, Yang JY, Chua NH** (2007) Independent and interdependent functions of LAF1 and HFR1 in phytochromeA signaling. *Genes & Development* **21**, 2100–2111.
- Jones MA, Raymond MJ, Yang Z, Smirnoff N** (2007) NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1261-1270
- Kang H, Zhu H, Chu X, Yang Z, Yuan S, Yu D, Wang C, Hong Z, Zhang Z** (2011) A novel interaction between CCaMK and a protein containing the Scythe_N ubiquitin-like domain in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **155**: 1312-1324
- Kiirika LM, Bergmann HF, Schikowsky C, Wimmer D, Korte J, Schmitz U, Niehaus K, Colditz F** (2012) Silencing of the Rac1 GTPase *MtROP9* in *Medicago truncatula* stimulates mycorrhizal and oomycete root colonization but negatively affects rhizobial infection. *Plant Physiol* DOI:10.1104/pp.112.193706
- Kiss E, Olah B, Kalo P, Morales M, Heckmann AB, Borbola A, Lozsa A, Kontar K, Middleton P, Downie JA, Oldroyd GE, Endre G** (2009) LIN, a novel type of U-box/WD40 protein, controls early infection by rhizobia in legumes. *Plant Physiol* **151**: 1239-1249
- Knight MR** (2007) New ideas on root hair growth appear from the flanks. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 20649-20650
- Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H** (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* **19**: 1065-1080
- Kumagai H, Hakoyama T, Umehara Y, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Kouchi H** (2007) A novel ankyrin-repeat membrane protein, IGN1, is required for persistence of nitrogen-fixing symbiosis in root nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **143**: 1293-1305
- Kuppusamy KT, Endre G, Prabhu R, Penmetsa RV, Veereshlingam H, Cook DR, Dickstein R, Vandenbosch KA** (2004) LIN, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiol* **136**: 3682-3691

Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *Embo J* **22**: 2623-2633

Lamb C, Dixon AR (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. **48**: 251-275

Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Herve C, Toth K, Bittencourt-Silvestre J, Klaus D, Deslandes L, Godiard L, Murray JD, Udvardi MK, Raffaele S, Mongrand S, Cullimore J, Gamas P, Niebel A, Ott T (2010) A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2343-2348

Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630-633

Lin F, Ding H, Wang J, Zhang H, Zhang A, Zhang Y, Tan M, Dong W, Jiang M (2009) Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. *J Exp Bot* **60**: 3221-3238

Liszak A, Kenk B, Schopfer (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217**: 658-667

Lohar DP, Haridas S, Gantt JS, VandenBosch KA (2007) A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol* **173**: 39-49

Lombardo F, Heckmann AB, Miwa H, Perry JA, Yano K, Hayashi M, Parniske M, Wang TL, Downie JA (2006) Identification of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus* affected in infection thread growth. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1444-1450

Marino D, Andrio E, Danchin EG, Oger E, Gucciardo S, Lambert A, Puppo A, Pauly N (2011) A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol* **189**: 580-592

Marsh JF, Rakocevic A, Mitra RM, Brocard L, Sun J, Eschstruth A, Long SR, Schultze M, Ratet P, Oldroyd GE (2007) *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* **144**: 324-335

Middleton PH, Jakab J, Penmetsa RV, Starker CG, Doll J, Kalo P, Prabhu R, Marsh JF, Mitra RM, Kereszt A, Dudas B, VandenBosch K, Long SR, Cook DR, Kiss GB, Oldroyd GE (2007) An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* **19**: 1221-1234

Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortés D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* **2**: ra45

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-498

Miyahara A, Richens J, Starker C, Morieri G, Smith L, Long S, Downie JA, Oldroyd GE (2010) Conservation in function of a SCAR/WAVE component during infection thread and root hair growth in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 1553-1562

Møller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 561-591

Monshausen GB, Bibikova TN, Messerli MA, Shi C, Gilroy S (2007) Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of Arabidopsis root hairs. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 20996-21001

Mori CI, Schroeder IJ (2004) Reactive oxygen species activation of Plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone. Transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. Update on Reactive oxygen species activation of Ca²⁺ channels. *Plant Physiol* **135**: 702-708

Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L, Szczyglowski K (2007) A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**: 101-104

Murray JD (2011) Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol Plant Microbe Interact* **6**: 631-639

Murray JD, Muni RR, Torres-Jerez I, Tang Y, Allen S, Andriankaja M, Li G, Laxmi A, Cheng X, Wen J, Vaughan D, Schultze M, Sun J, Charpentier M, Oldroyd G, Tadege M, Ratet P, Mysore KS, Chen R, Udvardi MK (2011) Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *Plant J* **65**: 244-252

Nakashima A, Chen L, Thao NP, Fujiwara M, Wong HL, Kuwano M, Umemura K, Shirasu K, Kawasaki T, Shimamoto K (2008) RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* **20**: 2265-2279

Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH (2006) Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature biotechnology* **24**: 1420

Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M, Shimizu T (2010) Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *Journal Bacteriol* **2**: 1435-1445

Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, Nara M, Suzuki K, Tanokura M, Kuchitsu K (2008) Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J Biol Chem* **283**: 8885-8892

Oldroyd GE, Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 519-546

- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA** (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119-144
- Olson PD, Varner JE** (1993) Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J* **4**: 867-892
- Ooki Y, Banba M, Yano K, Maruya J, Sato S, Tabata S, Saeki K, Hayashi M, Kawaguchi M, Izui K, Hata S** (2005) Characterization of the *Lotus japonicus* symbiotic mutant lot1 that shows a reduced nodule number and distorted trichomes. *Plant Physiol* **137**: 1261-1271
- Park KY, Jung JY, Park J, Hwang JU, Kim YW, Hwang I, Lee Y** (2003) A role of phosphatidylinositol 3-phosphate in abscisic acid-induced reactive oxygen species generation in guard cells. *Plant Physiol* **132**: 92-98
- Peleg-Grossman S, Volpin H, Levine A** (2007) Root hair curling and Rhizobium infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *J Exp Bot* **58**: 1637-1649
- Perret X, Staehelin C, Broughton JW** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 180-201
- Popp C, Ott T** (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 458-467
- Pourrut B, Perchet G, Silvestre J, Cecchi M, Guisresse M, Pinelli E** (2008) Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiol* **165**: 571-579
- Potocky M, Jones MA, Bezdova R, Smirnoff N, Zarsky V** (2007) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol* **174**: 742-751
- Ramírez M, Valderrama B, Arredondo-Peter R, Soberón M, Mora J, Hernández G** (1999) *Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin: effects on free-living and symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 1008-1015
- Ramu SK, Peng HM, Cook DR** (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**: 522-528
- Rentel CM, Lecourieux D, Ouaked F, Usher LS, Peterson L, Okamoto H, Knight H, Peck CS, Grierson SC, Hirt H, Knight RM** (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **427**: 858-861
- Ros Barceló A** (1998) The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase like enzyme. *Planta* **207**: 207-216
- Rubio MC, James EK, Clemente MR, Bucciarelli B, Fedorova M, Vance CP, Becana M** (2004) Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 1294-1305

- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R** (2004) Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* **16**: 616-628
- Sagi M, Fluhr R** (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* **141**: 336-340
- Sánchez-López R, Jáuregui D, Nava N, Alvarado-Affantranger X, Montiel J, Santana O, Sánchez F, Quinto C** (2011) Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant Cell Environ* **34**: 2109-2121
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DJ, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, et al.,** (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **463**: 178-183
- Santos R, Herouart D, Sigaud S, Touati D, Puppo A** (2001) Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 86-89
- Shaw SL, Long SR** (2003) Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol* **132**: 2196-2204
- Shimomura K, Nomura M, Tajima S, Kouchi H** (2006) LjnsRING, a novel RING finger protein, is required for symbiotic interactions between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **47**: 1572-1581
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP** (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* **31**: 137-147
- Sirichandra C, Gu D, Hu HC, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S, Kwak JM** (2009) Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* **583**: 2982-2986
- Suganuma N, Nakamura Y, Yamamoto M** (2003) The *Lotus japonicus Sen1* gene controls rhizobial differentiation into nitrogen-fixing bacteroids in nodules. *Mol Gen Genomics* **269**: 312-320
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R** (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 1-9
- Swanson S, Gilroy S** (2010) ROS in plant development. *Physiol Plant* **138**: 384-392
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L** (2008) Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* **319**: 1241-1244
- Tanaka A, Christensen MJ, Takemoto D, Park P, Scott B** (2006) Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *Plant Cell* **18**: 1052-1066
- Tansengco ML, Hayashi M, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Murooka Y** (2003) *crinkle*, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **131**: 1054-1063

Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J* **14**: 365-370

Torres MA, Dangl JL, Jones JD (2002) *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 517-522

Torres MA, Dangl JL (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 397-403

Torres MA, Jones JD, Dangl JL (2005) Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **37**: 1130-1134

Torres, MA (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plantarum* **138**: 414-429

Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**: 606-616

Tsyganov VE, Voroshilova VA, Priefer UB, Borisov AY, Tikhonovich IA (2002) Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium-pea* (*Pisum sativum* L.) symbiosis. *Ann Bot* **89**: 357-366

Valdés-López O, Arenas-Huertero C, Ramirez M, Girard L, Sánchez F, Vance CP, Luis Reyes J, Hernández G (2008) Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signaling in common bean roots. *Plant Cell Environ* **31**: 1834-1843

Vinuesa P, Neumann-Silkow F, Pacios-Bras C, Spaink HP, Martínez-Romero E, Werner D (2002) Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 159-168

Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K, Tabata R, Yaeno T, Hasegawa K, Kojima C, Yoshioka H, Iba K, Kawasaki T, Shimamoto K (2007) Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* **19**: 4022-4034

Xie F, Murray JD, Kim J, Heckmann AB, Edwards A, Oldroyd GE, Downie JA (2012) Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 633-638

Yano K, Tansengco ML, Hio T, Higashi K, Murooka Y, Imaizumi-Anraku H, Kawaguchi M, Hayashi M (2006) New nodulation mutants responsible for infection thread development in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 801-810

Yano K, Shibata S, Chen WL, Sato S, Kaneko T, Jurkiewicz A, Sandal N, Banba M, Imaizumi-Anraku H, Kojima T, Ohtomo R, Szczyglowski K, Stougaard J, Tabata S, Hayashi M, Kouchi H, Umehara Y (2009) CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats,

is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J* **60**: 168-180

Yokota K, Fukai E, Madsen LH, Jurkiewicz A, Rueda P, Radutoiu S, Held M, Hossain MS, Szczyglowski K, Morieri G, Oldroyd GE, Downie JA, Nielsen MW, Rusek AM, Sato S, Tabata S, James EK, Oyaizu H, Sandal N, Stougaard J (2009) Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell* **21**: 267-284

Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JD, Doke N (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **15**: 706-718

Zanetti ME, Blanco FA, Beker MP, Battaglia M, Aguilar OM (2010) A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell* **22**: 4142-4157

Tabla Suplementaria I. Anotación de las secuencias RBOHs utilizadas para el árbol filogenético.

Nombre	Anotación	Base de datos
HsNOX2	P04839	NCBI
AtRBOHA	At5g07390	NCBI
AtRBOHB	At1g09090	NCBI
AtRBOHC	At5g51060	NCBI
AtRBOHD	At5g47910	NCBI
AtRBOHE	At1g19230	NCBI
AtRBOHF	At1g64060	NCBI
AtRBOHG	At4g25090	NCBI
AtRBOHH	At5g60010	NCBI
AtRBOHI	At4g11230	NCBI
AtRBOHJ	At3g45810	NCBI
OsRBOHA	NP_916447	NCBI
OsRBOHB	AAT35117	NCBI
OsRBOHC	AK120905	NCBI
OsRBOHD	AK072353	NCBI
OsRBOHE	BAB89740	NCBI
OsRBOHF	XP_482730	NCBI
OsRBOHG	AK120739	NCBI
OsRBOHH	ABA99453	NCBI
OsRBOHI	ABA94089	NCBI
ZmRBOHA	GRMZM2G426953	Phytozome
ZmRBOHB	GRMZM2G138152	Phytozome
ZmRBOHC	GRMZM2G043435	Phytozome
ZmRBOHD	GRMZM2G441541	Phytozome
ZmRBOHE	GRMZM2G448185	Phytozome
ZmRBOHF	GRMZM2G300965	Phytozome
ZmRBOHG	GRMZM2G037993	Phytozome
ZmRBOHH	GRMZM2G323731	Phytozome
ZmRBOHI	GRMZM2G022547	Phytozome
ZmRBOHJ	GRMZM2G065144	Phytozome
ZmRBOHK	GRMZM2G358619	Phytozome
PtRBOHA	POPTR_0015s12130	Phytozome
PtRBOHB	POPTR_0005s02630	Phytozome
PtRBOHC	POPTR_0012s11340	Phytozome
PtRBOHD	POPTR_0001s12650	Phytozome
PtRBOHE	POPTR_0006s13950	Phytozome
PtRBOHF	POPTR_0001s09970	Phytozome

PtRBOHH	POPTR_0006s09850	Phytozome
PtRBOHI	POPTR_0003s13310	Phytozome
PtRBOHJ	POPTR_0016s11970	Phytozome
VvRBOHA	GSVIVG01014350001	Phytozome
VvRBOHB	GSVIVG01031128001	Phytozome
VvRBOHD	GSVIVG01001123001	Phytozome
VvRBOHE	GSVIVG01015025001	Phytozome
VvRBOHF	GSVIVG01019429001	Phytozome
VvRBOHH	GSVIVG01025074001	Phytozome
LjRBOHB	chr5.CM0299.380.nc	Kazusa
LjRBOHC	chr1.CM0094.200.nc	Kazusa
LjRBOHD	chr5.CM0299.370.nc	Kazusa
LjRBOHE	chr6.CM0013.340.nc	Kazusa
LjRBOHJ	chr1.CM0147.340.nc	Kazusa
MtRBOHA	Medtr1g099800	Phytozome
MtRBOHB	Medtr3g151540	Phytozome
MtRBOHC	Medtr3g151570	Phytozome
MtRBOHD	Medtr3g151600	Phytozome
MtRBOHE	Medtr4g144710	Phytozome
MtRBOHF	Medtr7g067680	Phytozome
MtRBOHG	Medtr7g138940	Phytozome
GmRBOHA	Glyma08g00880	Phytozome
GmRBOHB	Glyma19g42220	Phytozome
GmRBOHC	Glyma04g3804	Phytozome
GmRBOHD	Glyma10g29280	Phytozome
GmRBOHE	Glyma09g08470	Phytozome
GmRBOHF	Glyma08g02210	Phytozome
GmRBOHG	Glyma17g08610	Phytozome
GmRBOHH	Glyma07g15690	Phytozome
GmRBOHI	Glyma01g43190	Phytozome
GmRBOHJ	Glyma18g39500	Phytozome
GmRBOHK	Glyma15g20120	Phytozome
GmRBOHL	Glyma05g00420	Phytozome
GmRBOHM	Glyma06g17030	Phytozome
GmRBOHN	Glyma05g33280	Phytozome
GmRBOHO	Glyma03g39610	Phytozome
GmRBOHP	Glyma20g38000	Phytozome
GmRBOHQ	Glyma11g02310	Phytozome
GmRBOHR	Glyma05g37330	Phytozome
PvRBOHA	Phvulv091020621m.g	Phytozome

PvRBOHB	Phvulv091013731m.g	Phytozome
PvRBOHC	Phvulv091002467m.g	Phytozome
PvRBOHD	Phvulv091005473m.g	Phytozome
PvRBOHE	Phvulv091006195m.g	Phytozome
PvRBOHF	Phvulv091020738m.g	Phytozome
PvRBOHG	Phvulv091007712m.g	Phytozome
PvRBOHH	Phvulv091002934m.g	Phytozome
PvRBOHI	Phvulv091023888m.g	Phytozome

Tabla Suplementaria 2. Oligonucleótidos específicos para los ensayos de RT-qPCR.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del amplicón (bp)	Eficiencia de los oligonucleótidos (%)
Ef1α-Up	GGT CAT TGG TCA TGT CGA CTC TGG	146	98
Ef1α-Lw	GCA CCC AGG CAT ACT TGA ATG ACC		
RbohA-Up	GTG GAC TTC TAA GAG CAG AGT G	125	102
RbohA-Lw	CAG CAG AAC CAC CTC GTA CTC		
RbohB-Up	GGA AGG AGA TGC TCG ATC TGC	96	104.5
RbohB-Lw	GTC TTC ACC CTT GTC CCT GAA AC		
RbohC-Up	CCG GAG TCT CAA AGT CAA GTT C	107	98
RbohC-Lw	GAG CAC TGG GAC TTC CAT CTC		
RbohD-Up	CTA TAC GGA TGC GAA AGG C	99	101
RbohD-Lw	CAG TGC TAG AAC ATT TCC TGG G		
RbohE-Up	CAG CAC AAG ACT ACC AGC GC	157	96
RbohE-Lw	CCT CCT GGT GTT AAG TTT GAC G		
RbohF-Up	CTA GTC GGT CTC GGG ATA GGA G	129	95
RbohF-Lw	GAG AGA TGG TGA GTC AGT GG		
RbohG-Up	GAA CAC TCG GAG ACT GGA GC	148	90.5
RbohG-Lw	GGA CAT CCC TGT GAT CGT G		
RbohH-Up	GAT GTA GTT TCA GAA AGC CGG	100	98
RbohH-Lw	CTA TCC GAG AAC TTT GAT GCG AG		
RbohI-Up	GTC TCC GAT TCA AGT AGA GG	140	94
RbohI-Lw	GAA CCT TGT TCC CTT GTC AC		

ABREVIATURAS

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: Ácido ribonucleico interferente

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CM-H2DCFDA: 5-(y 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester

dpe: Días post-emergencia

dpg: Días post-germinación

dpi: Días post-inoculación

DPI: Dyphenilene iodonium

EORs: Especies de oxígeno reactivas

FAD: Flavina

FN: Factores de nodulación

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

GFP: Green fluorescent protein

GUS: Beta glucuronidasa

HI: Hilos de infección

NBT: Nitroblue tetrazolium

Ps: Pentámeros de *N*-acetil glucosamina

RBOH: Respiratory burst oxidase homolog

RT-qPCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

SD: Standard deviation

SEM: Standard error of the mean

TEM: Microscopía de transmisión de electrones

YFP: Yellow fluorescent protein