



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS**

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TIPO CINASA
CON DOMINIOS REPETIDOS RICOS EN LEUCINA
(PvSymRK) EN PELOS RADICALES DE FRIJOL TRATADOS
CON FACTORES DE NODULACIÓN”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

Biol. RAÚL DÁVILA DELGADO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ

Cuernavaca, Morelos

Junio 2012





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.

Este trabajo se realizó en el grupo de la Dra. María del Carmen Quinto Hernández, Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología-UNAM

Reconocimiento al apoyo para la realización del proyecto: beca CONACyT nivel maestría 0151193 y financiamiento parcial de proyectos **DGAPA-PAPIIT** IN221209 y IN203512.

Agradecimiento especial:

- ❖ A los técnicos Biol. Noreide Nava Núñez, Biol. Olivia Santana Estrada y M. en C. Juan Elías Olivares Grajales por todo su apoyo técnico.
- ❖ Al Dr. Gustavo Alva Pedraza y a la Dra. Marina Gavilánez Ruiz por sus aportaciones durante el desarrollo del proyecto.
- ❖ A la Dra. Gladys Cassab López, Dra. Claudia Treviño Santa cruz, Dra. Alicia Gamboa de Buen, Dr. Josep Dubrovsky, Dra. José Luis Reyes Taboada por todas sus aportaciones.

Abreviaturas

FBN	Fijación biológica de nitrógeno
Factores Nod	Factores de nodulación
LCO	Lipoquitooligosacárido
GlcNac	<i>N</i> -acetil-glucosamina
hpi	horas <i>post</i> -infección
IT	Hilo de infección (por sus siglas en inglés, <u>I</u> nfection <u>t</u> hread)
dpi	días <i>post</i> -infección
dpg	días <i>post</i> -germinación
ROS	especies de oxígeno reactivas (por sus siglas en inglés, <u>r</u> eactive <u>o</u> xxygen <u>s</u> pecies)
GFP	proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés, <u>G</u> reen <u>f</u> luorescence <u>p</u> rotein)
ATP	Adenosin trifosfato
Nod-	Nodulación menos
Sym	Symbiótico
NFR*	" <u>N</u> od <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor"
Nfp*	" <u>N</u> odulation <u>f</u> actor <u>p</u> erception"
LysM*	"Lysine motif"
CERK*	" <u>C</u> eramide <u>k</u> inase"
SymRK*	" <u>S</u> ymbiotic <u>r</u> eceptor like- <u>k</u> inase"
DMI1, 2, 3*	" <u>D</u> oesn't <u>m</u> ake <u>i</u> nfection 1, 2, 3"
CCaMK*	" <u>C</u> alcium <u>c</u> almodulin <u>k</u> inase"
IPD3*	" <u>I</u> nteracting <u>p</u> rotein of <u>D</u> MI3"
NSP1, 2*	" <u>N</u> odulation <u>s</u> ignaling <u>p</u> athway 1, 2"
ERN*	" <u>E</u> ts2 <u>r</u> epressor of <u>n</u> odulation"
NIN*	" <u>N</u> odule <u>i</u> nception"
ENOD*	" <u>E</u> arly <u>n</u> odulins"
Nup 85, 133*	"Nucleoporin 85, 133"
RLK-LRR*	" <u>R</u> eceptor-like <u>k</u> inase <u>l</u> eucine <u>r</u> ich <u>r</u> epeat"
LRR*	" <u>l</u> eucine <u>r</u> ich <u>r</u> epeat"
NORK*	" <u>N</u> odule <u>r</u> eceptor <u>k</u> inase"
Kb	kilobases
KDa	kilodaltones
HMGR	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima a reductasa1
GUS	Enzima β -glucuronidasa (por sus siglas en inglés "Beta-glucuronidase")
CTER	Carboxilo terminal de PvSymRK
RNAi	RNA interferente
cDNA	DNA complementario
qRT-PCR*	"Quantitative Retro Transcriptase-Polymerase Chain Reaction"
EF1 α *	"Elongation factor 1 α "
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
PA*	"Phosphatase alkaline"
HRP*	"Horseradish peroxidase"
UTR*	"Untranslated region"

*Por razones prácticas, se optó por utilizar nomenclatura original en inglés.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Las leguminosas	3
1.2 El frijol	4
1.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno	4
1.4 Simbiosis leguminosa-rhizobia	5
1.5 Los flavonoides exudados por la raíz de la leguminosa son la primera señal.....	7
1.6 Los factores de nodulación son los intermediarios bacterianos	8
1.7 Respuestas inducidas por los factores Nod	9
1.8 Proceso de infección y organogénesis del nódulo fijador de nitrógeno..	11
1.9 Tipos de nódulos	13
1.10 El pelo radical en la planta modelo <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
1.11 El pelo radical de leguminosas.....	17
1.12 El pelo radical de frijol	18
1.13 Biología molecular de la nodulación.....	19
1.14 Percepción de los factores Nod	19
1.15 Transducción de señales	21
1.16 Nodulinas	23
2. ANTECEDENTES	
2.1 Receptores tipo RLK-LRR.....	24

2.2	La participación de SymRK (y ortólogos DMI2 y NORK) en la simbiosis.....	26
2.3	<i>PvSymRK</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i>	29
3.	HIPÓTESIS	32
4.	OBJETIVO	32
4.1	Objetivo general	32
4.2	Objetivos específicos	32
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1	Germinación de semillas de frijol variedad Negro Jamapa	33
5.2	Aislamiento de pelos radicales	33
5.3	Extracción de RNA a partir de pelos radicales y expresión génica por RT-qPCR.....	34
5.4	Extracción de proteínas a partir de pelos radicales.....	35
5.5	Precipitación de proteínas con cloroformo-metanol	35
5.6	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
5.7	Análisis tipo Western blot	36
5.8	Amplificación por PCR	37
5.9	Método de amplificación por PCR a partir de colonia bacteriana.....	38
5.10	Sistema Gateway de clonación por recombinación.....	39
5.11	Transformación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> y <i>A. tumefaciens</i>	39
5.12	Agroinfiltración de hojas de tabaco	39
5.13	Observación de hojas de tabaco agroinfiltradas	41
5.14	Generación de raíces transgénicas de frijol que expresen las proteínas quiméricas <i>PvSymRK-GFP</i> y <i>GUS-GFP</i>	41
5.15	Incubación con factores Nod	42

5.16	Captura y procesamiento de imágenes.....	42
------	--	----

6. RESULTADOS

6.1	Análisis de la expresión del receptor <i>PvSymRK</i> en pelos radicales de plántulas de frijol de diferentes edades (2, 3, y 4 días <i>post-germinación</i>)	43
	-Expresión del transcrito de <i>PvSymRK</i> en pelos radicales de frijol ..	43
	-Detección de <i>PvSymRK</i> en extracto total de proteínas de pelos radicales de frijol	44
6.2	Detección de <i>PvSymRK</i> por ensayos de Western blot en extracto total de proteínas de pelos radicales con anticuerpos inmunopurificados	47
6.3	Generación de raíces transgénicas de frijol que expresen el receptor quimérico <i>PvSymRK-GFP</i>	50
	-Construcción y clonación del cassette de expresión p35S:: <i>PvSymRK-GFP</i> en un vector de expresión en plantas	50
	-Estructura primaria de la quimera fluorescente <i>PvSymRK-GFP</i>	53
	-Construcción y clonación del cassette de expresión p35S:: <i>GUS-GFP</i> en un vector de expresión en plantas.....	53
	-Estructura primaria de <i>GUS-GFP</i>	55
6.4	Análisis de la expresión de la proteína quimérica fluorescente <i>PvSymRK-GFP</i> en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> agroinfiltradas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
6.5	Análisis de la expresión de la proteína quimérica fluorescente <i>PvSymRK-GFP</i> en raíces transgénicas de frijol	58
6.6	Análisis, por microscopía de epifluorescencia, del efecto de los factores Nod sobre la distribución de <i>PvSymRK-GFP</i> en pelos radicales de raíces transgénicas de frijol	62

7. DISCUSIÓN.....	66
8. CONCLUSIONES.....	71
9. PERSPECTIVAS.....	72
10. ANEXO	
10.1 Inmunopurificación de anticuerpos <i>anti-PvSymRK</i> (Ab <i>anti-CTER</i>) .	73
-Precipitación de inmunoglobulinas.....	74
-Acoplar el antígeno a un soporte tipo sefarosa	75
-Purificación de Thio-CTER	75
-Purificación de tiorredoxina	76
-Purificación de los anticuerpos <i>anti-PvSymRKCTER</i> (Ab <i>anti-CTER</i>) por cromatografía de inmunoafinidad.....	79
-Characterización de anticuerpos <i>anti-CTER</i> inmunopurificados	80
Protocolos.....	82
a) Inducción de la expresión de proteínas recombinantes	82
b) Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a níquel	83
c) Purificación de proteínas recombinantes por el método de choque osmótico (ThioFusion TM , Invitrogen).....	83
d) Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión que contienen Thio-CTER	84
e) Purificación de IgG's	85
f) Acoplamiento de proteínas Thio y Thio-CTER a sefarosa 4B-CNBr.	85
g) Purificación de anticuerpos <i>anti-CTER</i> por cromatografía de inmunoafinidad	85
11. LITERATURA CITADA	87

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1 Diálogo molecular que se establece entre la planta leguminosa y la rizobacteria	6
Fig. 2 Estructura general de los factores Nod.....	9
Fig. 3 Tiempos de las respuestas celulares y morfológicas asociadas a los factores Nod en pelos radicales.....	11
Fig. 4 Proceso de infección y organogénesis del nódulo fijador de nitrógeno (tipo determinado).....	13
Fig. 5 Micrografía de pelos radicales vivos de frijol en crecimiento, sin inoculación con microsimbionte	15
Fig. 6 Modelo de la señalización inducida por los factores Nod en una célula epidermal.....	21
Fig. 7 Estructura primaria de <i>PvSymRK</i>	29
Fig. 8 Análisis de la acumulación del transcrito de <i>PvSymRK</i> en pelos radicales de frijol de 2 dpj.....	44
Fig. 9 Análisis electroforético de extracto total de proteínas de pelos radicales de frijol de 2 dpj.....	45
Fig. 10 Análisis por Western blot de la expresión de <i>PvSymRK</i> en pelos radicales de frijol de 2 dpj.....	46
Fig. 11 Sensibilidad de la inmunodetección de Thio-CTER con anticuerpos <i>anti</i> -CTER utilizando el método de quimioluminiscencia	48
Fig. 12 Reconocimiento de <i>PvSymRK</i> por los anticuerpos <i>anti</i> -CTER	49
Fig. 13 Amplificación por PCR de <i>PvSymRK</i>	51

Fig. 14 Análisis por PCR de las clonas pENTR-5'PvSymRK4 y pENTR-5'PvSymRK10	51
Fig. 15 Análisis por PCR de las clonas pH7FWG2-5'PvSymRK utilizando oligonucleótidos específicos	52
Fig. 16 Proteína quimérica PvSymRK-GFP	53
Fig. 17 Etapas de construcción y clonación del cassette de expresión p35S::GUS-GFP	54
Fig. 18 Proteína quimérica GUS-GFP	55
Fig. 19 Análisis por microscopía de epifluorescencia de células del pavimento de hojas de tabaco agroinfiltradas con <i>A. tumefaciens</i> transformada con pH7FWG2-5'PvSymRK12 y pH7FWG2-GUS7	57
Fig. 20 Análisis por microscopía de epifluorescencia de células vivas de la epidermis de raíces transgénicas que expresan PvSymRK-GFP o GUS-GFP	60
Fig. 21 Análisis por microscopía de epifluorescencia de pelos radicales vivos de raíces transgénicas que expresan PvSymRK-GFP o GUS-GFP..	61
Fig. 22 Efecto de los factores Nod sobre la expresión y distribución de GUS-GFP	63
Fig. 23 Efecto de los factores Nod sobre la expresión y distribución de PvSymRK-GFP	65
Fig. 24 Estrategia de inmunopurificación de anticuerpos <i>anti</i> -CTER y <i>anti</i> -Thio.....	74
Fig. 25 Aislamiento de cuerpos de inclusión que contienen Thio-CTER	76
Fig. 26 Purificación de tiorredoxina por Choque Osmótico	77

Fig. 27 Análisis de la especificidad de la fracción de IgG's <i>anti-PvSymRK-CTER</i> por la proteína Thio-CTER mediante ensayo tipo Western blot	78
Fig. 28 Análisis de la especificidad de la fracción IgG's <i>anti-PvSymRK-CTER</i> por la proteína tiorredoxina mediante ensayo tipo Western blot	79
Fig. 29 Cromatografía de inmunoafinidad.....	80
Fig. 30 Análisis de especificidad de anticuerpos inmunopurificados	81
Fig. 31 Determinación de la concentración mínima de Thio-CTER detectada por la fracción 18 de anticuerpos <i>anti-CTER</i> (dilución 1:50).....	82
Tabla 1. Funciones de RLK-LRR en plantas.....	25
Tabla 2. Oligonucleótidos específicos de <i>PvSymRK</i> (1-10), GFP (11) o GUS (13-16) utilizados en el presente trabajo.....	38

RESUMEN

Las plantas leguminosas establecen interacciones simbióticas con rizobia conduciendo a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las plantas. La nodulación se inicia por señales bacterianas específicas (conocidas como factores Nod), las cuales son reconocidas por los pelos radicales en donde inducen una serie de respuestas moleculares, fisiológicas y morfológicas que conducen al proceso de infección y organogénesis del nódulo. El receptor de membrana tipo cinasa con dominios repetidos ricos en leucina SymRK (también conocido como NORK o DMI2), es un miembro de la vía de señalización simbiótica común en plantas. En la nodulación en leguminosas, SymRK está involucrado en el proceso de invasión del pelo radical, así como en la formación del hilo de infección y del simbiosoma. En este trabajo se llevó a cabo la expresión y localización celular de PvSymRK en pelos radicales de *Phaseolus vulgaris*. Para tener información sobre la expresión de PvSymRK en pelos radicales, se realizó un análisis comparativo por qRT-PCR. Los pelos radicales presentaron una mayor acumulación de transcrito de PvSymRK que las raíces rasuradas (raíces sin pelos radicales) y los ápices de raíz. Análisis por Western blot, usando anticuerpos *anti-PvSymRK* sobre extracto total de proteínas de pelos radicales de 2, 3 y 4 días *post-germinación* detectaron una banda del peso molecular esperado, 100 KDa, indicando que el receptor está presente en pelos radicales. Para analizar la distribución celular del receptor, se expresó una proteína quimérica fluorescente, PvSymRK-GFP, en hojas de *Nicotiana benthamiana* y en raíces pilosas de frijol. En hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas, PvSymRK-GFP se localizó en la membrana plasmática de las células transformadas; como control, se transformaron células de hojas con la quimera GUS-GFP, la cual se distribuyó homogéneamente en el citoplasma. Cuando se expresó en el sistema de raíces pilosas bajo el control del promotor 35S, PvSymRK-GFP se encontró asociado a la membrana plasmática de las células epidermales y de los pelos radicales. Resultados preliminares sobre efecto de la incubación con factores Nod sobre la distribución de PvSymRK-GFP en pelos radicales mostraron que PvSymRK-GFP presentó un cambio de distribución de la membrana plasmática hacia el citoplasma pocos segundos después de la incubación con factores Nod, probablemente indicando internalización de PvSymRK-GFP.

ABSTRACT

Legume plants establish symbiotic interactions with rhizobia, leading to the formation of nitrogen-fixing nodules on plant roots. Nodulation is initiated by specific bacterial signals (called Nod factors), which are recognized by root hairs and trigger a series of molecular, physiological and morphological responses conducting to the infection process and nodule organogenesis. The membrane leucine-rich repeat receptor-like kinase SymRK (also known as NORK or DMI2), is a member of the common symbiosis signaling pathway in plants. In legume nodulation, SymRK is involved in the root hair invasion process, as well as in the formation of both the infection thread and the symbiosome. In this study we addressed the expression and cell localization of *PvSymRK* in *Phaseolus vulgaris* root hairs. To gain insights into the expression of *PvSymRK* in root hairs, we have performed a comparative qRT-PCR analysis. Root hairs contained a higher proportion of *PvSymRK* transcripts than stripped roots (roots devoid of root hairs) and apical roots. Western blot analysis, using antibodies *anti-PvSymRK* on total extract protein of root hairs of 2, 3 and 4 days after germination detected a band of the predicted molecular weight of 100 KDa, indicating that the receptor is present in root hairs. To analyze cell distribution of this receptor, we expressed a fluorescent protein chimera, *PvSymRK-GFP*, in *Nicotiana benthamiana* leaves and in common bean hairy roots system. In agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves, *PvSymRK-GFP* was localized in the plasma membrane of transformed cells; as control, leaf cells were transformed with GUS-GFP chimera, which was homogeneously distributed in the cytoplasm. When expressed in a hairy root system under control of 35S promoter, *PvSymRK-GFP* was found associated to the plasma membrane of epidermal and roots hair cells. Preliminary results about the effect of Nod factor incubation on the distribution of *PvSymRK-GFP* on the root hairs showed that *PvSymRK-GFP* had a change of distribution from plasma membrane to cytoplasmic after a few seconds of incubation with Nod factors, probably indicating internalization of *PvSymRK-GFP*.

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1 Las leguminosas.

Las leguminosas son un grupo de plantas muy numerosas, identificado con el orden de las Fabales (Watson y Dallwitz, 1992), que incluye aproximadamente 19,400 especies (Judd *et al.*, 2002). Las leguminosas tienen gran importancia desde el punto de vista económico ya que incluyen a especies que se utilizan como alimento, por ejemplo el chícharo, el frijol, el cacahuate y la soya; algunas son de interés forrajero como el trébol y la alfalfa o especies ornamentales como la falsa acacia. Las leguminosas constituyen un grupo diverso con distribución mundial, constituido por especies herbáceas, trepadoras, arbóreas, arbustivas e incluso acuáticas. El fruto, llamado legumbre, es lo que caracteriza a las leguminosas y es una vaina aplanada con una sola cámara y dos suturas, que suele abrirse a lo largo de éstas. Las semillas están unidas, longitudinalmente, a una de las suturas, y puede ser indehisciente (la vaina no se abre) o dehiscente (la vaina se abre) de forma explosiva, su tamaño oscila entre unos milímetros y más de treinta centímetros, puede encerrar una o muchas semillas y ser de color apagado o vivo (Watson y Dallwitz, 1992).

Desde el punto de vista taxonómico, el orden Fabales se subdivide en tres familias: la familia Mimosaceae que engloba unas 3,300 especies, entre las que se incluyen las acacias y las mimosas; la familia Caesalpiniaceae que agrupa 1,900 especies leñosas, en su mayoría con hojas compuestas y flores irregulares, y la familia Fabaceae o Papilionaceae, que está formada por unas 13,900 especies fundamentalmente herbáceas, aunque también hay especies trepadoras, arbustivas o arbóreas (Watson y Dallwitz, 1992).

1.2 El frijol.

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es la especie más conocida del género *Phaseolus* spp. de la familia Fabaceae, la cual se originó en Mesoamérica (Bitocchi *et al.*, 2011). El cultivo del frijol es uno de los más antiguos del mundo; junto con el maíz y la yuca (*Manihot esculenta*), han sido un alimento básico dominante en toda América debido a que, en particular el frijol presenta una adaptabilidad a diferentes ambientes. En África y Latinoamérica, el frijol es una de las principales fuentes de proteínas en la alimentación, se utilizan las semillas y vainas de estas plantas herbáceas como alimento humano en gran parte de numerosos platillos típicos. Por otro lado las hojas se usan en la producción de forraje destinada para el ganado.

En México, el frijol es un cultivo importante económica y socialmente, ya que ocupa el segundo lugar en superficie de cultivo a nivel nacional, con un promedio de 1.85 millones de hectáreas sembradas (Velia *et al.*, 2006; <http://www.frijol.gob.mx/index.php?portal=frijol>) y representa además la segunda actividad agrícola más importante en el país pues de acuerdo con cifras oficiales, existen 570 mil productores, además de que genera un total de 76 millones de jornales, que equivalen a 382 mil empleos permanentes (Velia *et al.*, 2006). Es así que, como generador de empleo, el frijol es relevante dentro de la economía del sector rural. Así mismo, es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que constituye la fuente principal de proteínas para dicho sector.

1.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno.

Una producción agrícola de alta calidad y rica en proteína depende fundamentalmente de la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Los nutrientes necesarios para el correcto crecimiento de las plantas son el nitrógeno, el potasio, el fósforo, el hierro, el calcio, el azufre y el magnesio, los cuales están presentes

en la mayoría de los suelos cultivables en cantidades variables y limitantes. El nitrógeno representa un elemento de importancia vital debido a que forma parte de biomoléculas esenciales como aminoácidos y ácidos nucleicos. El nitrógeno se encuentra presente en un 78.03% del volumen del aire en forma de N_2 ; en el suelo se encuentra en forma de minerales como por ejemplo KNO_3 y $NaNO_3$ y se asimila por la epidermis de la raíz (incluidos los pelos radicales) (Taiz y Zeiger, 2006). Cuando existe carencia de fuentes de nitrógeno en el suelo, el frijol y otras leguminosas pueden asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno para suplir esta deficiencia.

Algunas bacterias, en vida libre, pueden transformar el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_3), tal es el caso de bacterias de los géneros *Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Rhodospirillum*, etc. Muchos de estos fijadores de nitrógeno procarióticos viven en el suelo, generalmente independientes de otros organismos. Mientras que algunos otros microorganismos pueden formar asociaciones simbióticas con plantas superiores; por ejemplo, actinobacterias del género *Frankia* se asocian con plantas de los géneros *Casuarina*, *Datisca* y *Cenothus* (y con todos los Rosales); cianobacterias como *Nostoc* se asocian con plantas del género *Gunnera*, entre otras (Taiz y Zeiger, 2006; Pawlowski y Demchenko, 2012).

Sin embargo, la simbiosis más común ocurre entre plantas leguminosas y las bacterias del suelo, gram negativas, de los géneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Photorhizobium* y *Bradyrhizobium*, colectivamente llamadas rhizobia (Taiz y Zeiger, 2006).

1.4 Simbiosis leguminosa-rhizobia.

Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, la simbiosis entre las plantas leguminosas y rhizobia, se caracteriza por la formación de un nuevo órgano en la planta, el nódulo fijador de nitrógeno, donde las bacterias se alojan y llevan a cabo

la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Usualmente, los nódulos se forman en las raíces y con baja frecuencia en los tallos de algunas leguminosas. En esta simbiosis las bacterias aportan a la planta una fuente de nitrógeno para la síntesis de moléculas como aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. A cambio, la leguminosa cede a la rhizobia esqueletos de carbono para sus funciones vitales (Taiz y Zeiger, 2006). La asociación simbiótica entre las rhizobia y las plantas leguminosas es un proceso específico, pero a su vez complejo, que requiere del intercambio de señales químicas entre la planta y la bacteria (Fig. 1).

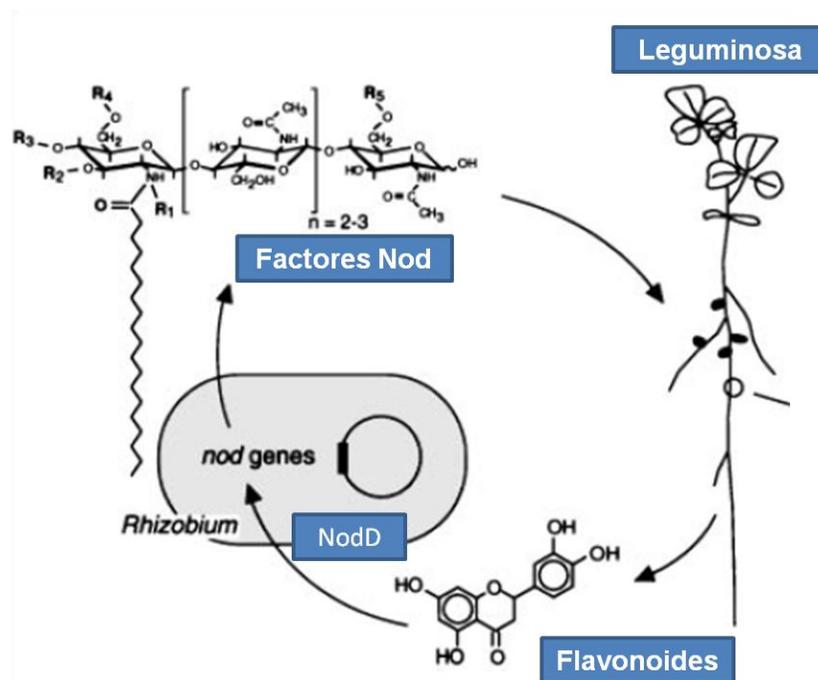


Fig. 1 Diálogo molecular que se establece entre la planta leguminosa y rhizobia. La planta secreta flavonoides específicos a la rizósfera, los cuales son reconocidos por la bacteria mediante el activador transcripcional NodD, lo que induce la transcripción de genes bacterianos *nod*, cuyos productos son proteínas encargadas de la síntesis y secreción de los factores Nod específicos. Los factores Nod le permiten a las bacterias iniciar el proceso de infección en la planta e inducir la formación de nódulos. Modificada de Schultze y Kondorosi, 1998.

1.5 Los flavonoides exudados por la raíz de la leguminosa son la primera señal.

El proceso que conduce a la simbiosis inicia cuando la bacteria reconoce compuestos de tipo flavonoides liberados por la raíz de la leguminosa a la rizósfera o zona de intensa actividad microbiana alrededor de las raíces (Schultze y Kondorosi, 1998) (Fig. 1). Los flavonoides son un grupo de compuestos hidrofóbicos de naturaleza fenólica, producidos en plantas superiores por la vía de los fenilpropanoides y son considerados como moléculas del metabolismo secundario (Peters *et al.*, 1986). Se clasifican en varios grupos: antocianidinas, flavonoles, flavonas, flavanoles, flavanonas, chalconas, dihidrochalconas, dihidroflavonoles, isoflavonoides y pterocarpenos. Su biosíntesis ocurre en varias partes de las plantas (raíz, hoja, flores). Además de su función en la simbiosis, estos compuestos juegan un papel muy importante en procesos asociados a la protección contra daño por luz ultravioleta y por microbios patógenos. También actúan como pigmentos o co-pigmentos en las flores y modulando la distribución de auxinas (Peters *et al.*, 1986; Hirsch, 1992).

La naturaleza química de la mezcla de flavonoides exudados por las raíces de cada leguminosa es importante en términos de la especificidad o compatibilidad de la interacción simbiótica (Hirsch, 1992), es decir, solo una mezcla de flavonoides será reconocida por las bacterias compatibles; por ejemplo, en frijol se secretan naringenina y genisteina que son reconocidos por *R. leguminosarum* bv *viciae*, *R. tropici* y *R. etli* (Hirsch, 1992). Los flavonoides tienen un efecto quimioattractante sobre las rhizobia compatibles. El reconocimiento específico está mediado por el activador transcripcional bacteriano NodD, asociado a la membrana plasmática, el cual al interactuar con los flavonoides sufre un cambio conformacional que promueve que la RNA polimerasa bacteriana inicie la transcripción de los genes bacterianos de nodulación (genes *nod*). Estos genes se han agrupado en genes *nod* comunes (*nodABC*) y en genes *nod* involucrados en la especificidad del hospedero (*nodFE*, *nodG*, *nodH* y *nodL*) (Hirsch, 1992). Los productos de estos

genes son proteínas encargadas de la síntesis y secreción de metabolitos llamados factores de nodulación.

1.6 Los factores de nodulación son los intermediarios bacterianos.

Los factores de nodulación (factores Nod) son lipoquitooligosacáridos (LCO) formados por un esqueleto de 3 a 6 unidades de *N*-acetil-glucosamina (GlcNac) unidas por enlaces tipo β -1,4 (Fig. 2). El grupo *N*-acetil del extremo no reductor del esqueleto está unido a una cadena de ácido graso. La estructura básica del LCO es común en todas las rhizobia y está determinada por los genes *nod* comunes que codifican para las enzimas NodC, (sintasa del quitooligosacárido), NodB (desacetilasa que remueve específicamente el grupo acetil en el extremo no reductor) y NodA (transfiere la cadena acilo al extremo no reductor). Dependiendo de las especies de rhizobia, la cadena del ácido graso varía en longitud y en cantidad de insaturaciones. Por otro lado, ambos extremos, el reductor y el no reductor del esqueleto del LCO portan sustituciones tipo grupos sulfato, fucosil, manosil o arabinosil, entre otros. Los genes *nod* involucrados en la especificidad del hospedero son los responsables de estas modificaciones. Así, cada especie de rhizobia produce un espectro único de factores Nod (Hirsch, 1992; Roche *et al.*, 1991).

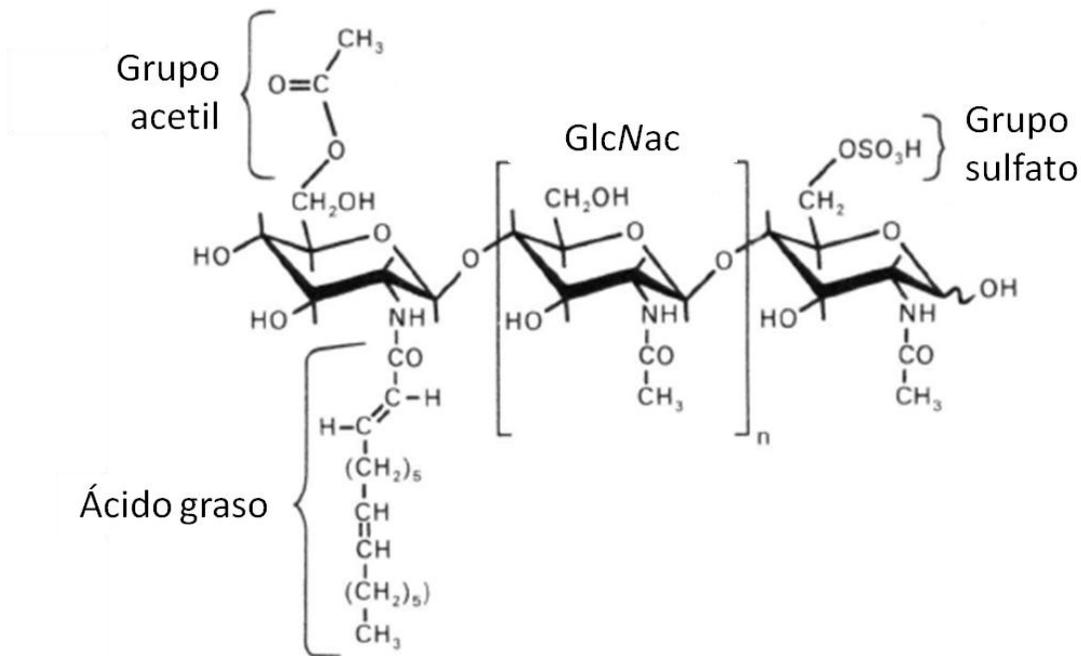


Fig. 2 Estructura general de los factores Nod. n se refiere al número de residuos de GlcNac. Modificada de de-Bruijn y Downie (1991).

1.7 Respuestas inducidas por los factores Nod.

Los factores Nod son percibidos por receptores (se describirán más abajo) en la membrana del pelo radical de la leguminosa, lo cual induce varias respuestas fisiológicas, morfológicas, celulares y moleculares en esta célula (Cárdenas *et al.*, 1999). Si bien nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares involucrados en tales respuestas es aún pobre, los avances se sustentan, por un lado, en la caracterización de leguminosas mutantes deficientes en nodulación y en experimentos de genética reversa en leguminosas. Por otro lado, el establecimiento de métodos de purificación y cuantificación de factores Nod producidos por rizobia cultivadas en condiciones de laboratorio ha sido una herramienta con gran valor experimental (Dénarie y Cullimore, 1993; Schultze *et al.*, 1994; Cárdenas *et al.*, 1995; Downie y Walker, 1999). Su uso ha mostrado que, a concentraciones nanomolares, los factores Nod mimetizan las respuestas inducidas en los pelos radicales al ser inoculados con las rizobia compatibles

(Schultze *et al.*, 1994; Mylona *et al.*, 1995; Cárdenas *et al.*, 1995; Dénarié *et al.*, 1996; Cárdenas *et al.*, 1999). Entre las respuestas fisiológicas, morfológicas y celulares reportadas en la literatura como inducidas por los factores Nod en el pelo radical se pueden citar el influjo de iones calcio, potasio y cloro en el ápice de la célula, la despolarización de la membrana plasmática, la alcalinización del entorno extracelular, cambios en el pH intracelular, oscilaciones de calcio, rearrreglos de actina, paro y reinicio del crecimiento apical, así como deformación del pelo radical, entre otras (Heidstra *et al.*, 1997; DeRuijter *et al.*, 1998; Cárdenas *et al.*, 1999; Cárdenas *et al.*, 2000). Estas respuestas han sido recapituladas por Cárdenas *et al.*, 2000, tal como se ilustra en la figura 3. La rapidez, duración y orden sucesivo en que se presentan estos cambios sugieren la participación de una o varias cascadas de señalización que involucran algunas proteínas receptoras ya identificadas (Oldroyd y Downie, 2008). Descifrar algunos de los mecanismos moleculares involucrados en esos procesos ha sido una tarea difícil y laboriosa, y aún falta mucho por avanzar.

No obstante, el desarrollo de nuevas metodologías moleculares ha favorecido la identificación de algunos de los participantes, tales como activadores transcripcionales, receptores tipo cinasa, proteínas asociadas a la transducción de señales, etc. La naturaleza y función de algunas de estas proteínas se describirán más adelante.

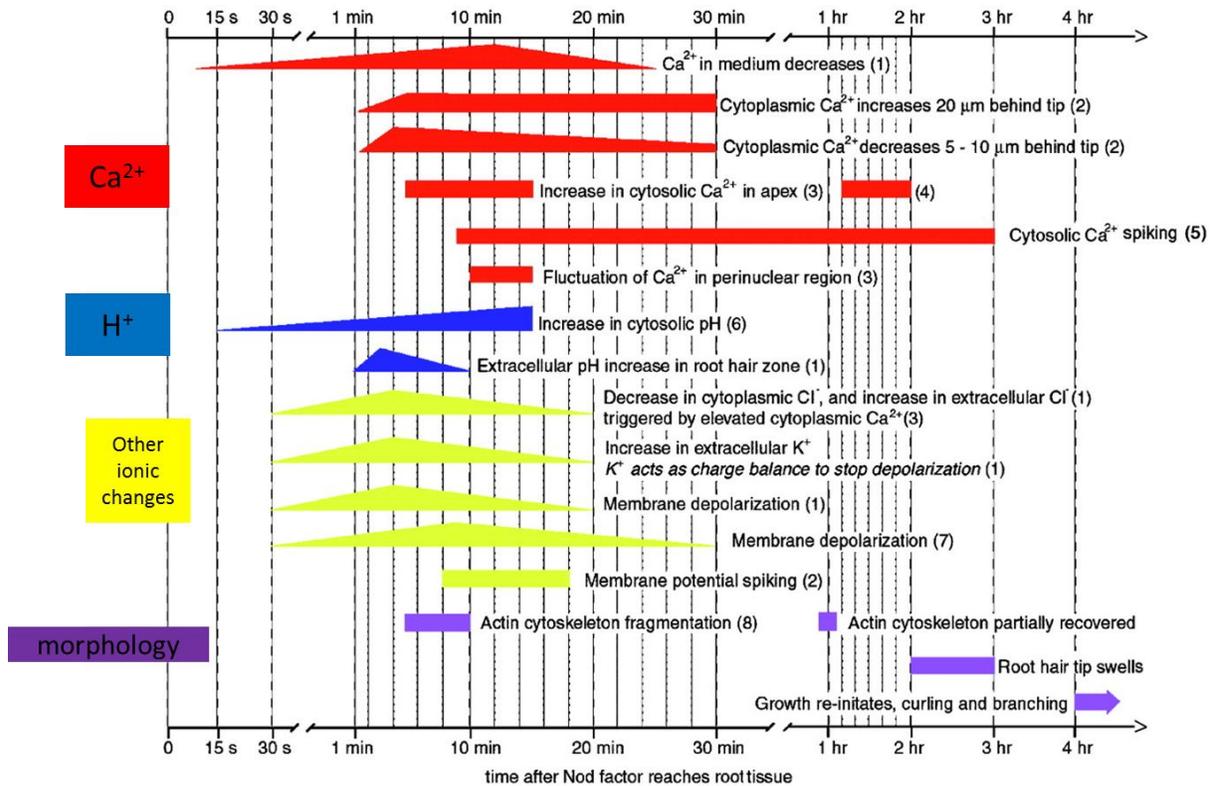


Fig. 3 Escala de tiempo en la que se observan las respuestas celulares y morfológicas asociadas a la percepción de los factores Nod en pelos radicales. Tomada de Cárdenas *et al.*, 2000.

1.8 Proceso de infección y organogénesis del nódulo fijador de nitrógeno.

En cierto modo, se puede considerar que, en su conjunto, los cambios inducidos en el pelo radical por la percepción de los factores Nod o inoculación con rhizobia conducen al pelo radical a un estado de activación que lo “capacita” o “faculta” como una célula competente para la interacción e infección, no patogénica sino simbiótica, con rhizobia.

La infección inicia cuando las rhizobia, atraídas químicamente por los flavonoides, se adhieren a la región apical del pelo radical mediante una proteína bacteriana específica de adherencia, la ricadesina (López-Lara, 2000) (Fig. 4 a). Los exopolisacáridos de la superficie bacteriana y algunas lectinas de la planta también están involucrados en la adherencia de la bacteria al ápice del pelo

radical (Hirsch, 1992; Smit *et al.*, 1992). Por otro lado, se sabe que el extremo apical de los pelos radicales recién emergentes, y en franco crecimiento, presentan una pared celular delgada y flexible gracias al bajo entrecruzamiento de celulosa y hemicelulosa, favoreciendo los cambios morfológicos necesarios para establecer el sitio de infección (Smit *et al.*, 1992). En respuesta a la adhesión de las bacterias, el pelo radical se enrosca (12-24 horas *post*-infección o hpi), atrapando las bacterias en el sitio de encurvamiento (Fig. 4 b). En ese sitio del pelo radical, la pared celular se degrada parcialmente y la membrana plasmática se invagina dando lugar a la formación de una estructura tubular intracelular conocida como hilo de infección o IT (por su siglas en inglés, 48-72 hpi), conducto por el cual la bacteria infecta el pelo radical (Fig. 4 b); eventualmente el hilo de infección se elonga (Fig. 4 b) y ramifica hacia las células del córtex permitiendo el avance de las bacterias en constante división (Stacey *et al.*, 2006).

La organogénesis o desarrollo del nódulo es un proceso que inicia de manera paralela y adyacente a la formación del hilo de infección. Este proceso implica varias etapas, a saber: las células corticales reactivan su ciclo celular (Fig. 4 b) dando lugar a la formación del primordio de nódulo (3-5 dpi), el cual emerge de la raíz (Fig. 4 c). El desarrollo del primordio de nódulo implica la formación de un sistema de haces vasculares que surge del eje vascular (*stele*) de la raíz o cilindro central y conecta a éste con el primordio de nódulo. Los haces vasculares del primordio de nódulo se ramifican y se extienden de manera periférica hacia la zona apical del nódulo en desarrollo. Cuando el hilo de infección llega al primordio de nódulo, las rhizobia son vaciadas hacia el entorno intracelular de las células corticales del primordio de nódulo mediante un mecanismo que recuerda la endocitosis (Fig. 4 c). Posteriormente, las bacterias se diferencian a bacteroides dentro de una estructura subcelular *quasi*-organelo, conocida como simbiosoma (10 dpi) (Fig. 4 c). Conforme el tamaño del primordio de nódulo aumenta y el número de células infectadas se incrementa, se inicia la maduración del nódulo, que se caracteriza por la actividad que presentan los bacteroides de fijación de N₂ atmosférico para convertirlo en NH₃ mediante un complejo enzimático conocido

como nitrogenasa (10-21 dpi) (Fig. 4 d). El sistema vascular raíz-nódulo facilita el intercambio de nitrógeno fijado y nutrientes entre la planta y la bacteria (López-Lara, 2000).

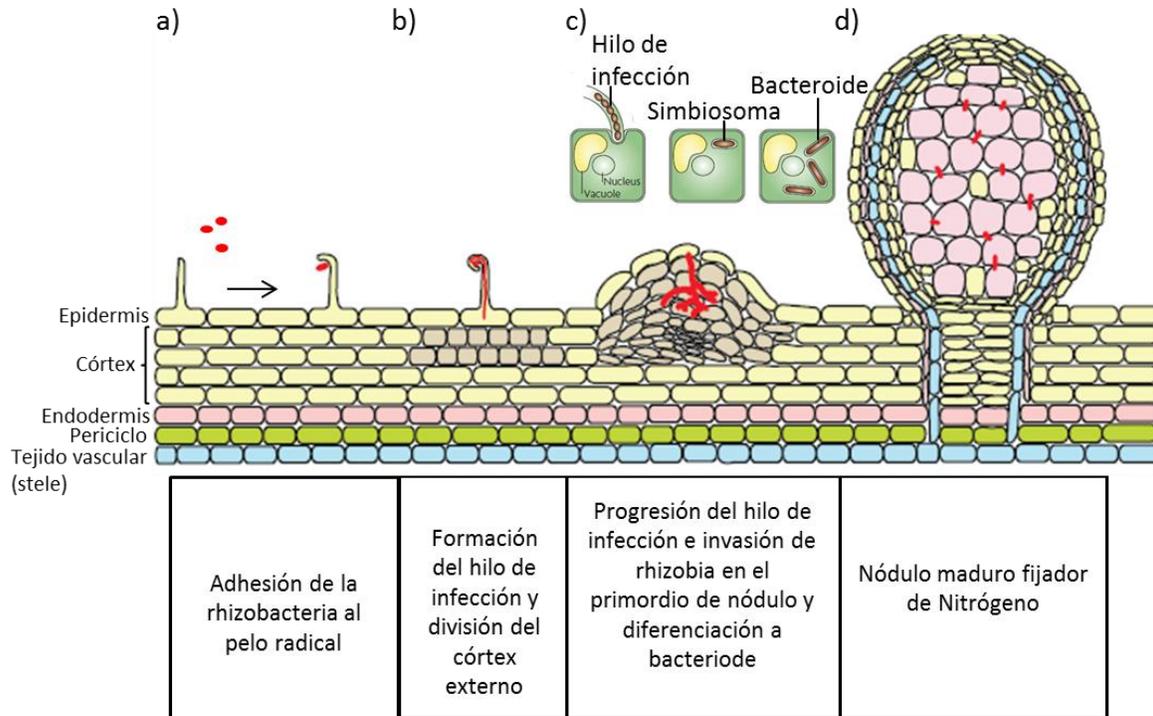


Fig. 4 Proceso de infección y organogénesis del nódulo fijador de nitrógeno (tipo determinado). Modificado de Popp y Ott, 2011 y complementada con imágenes de Jones *et al.*, 2007.

1.9 Tipos de nódulos.

Las leguminosas pueden formar uno de dos tipos de nódulos, ya sea tipo indeterminado o determinado. El tipo de nódulo que se forma depende de la planta hospedera, no de la cepa de rizobia que infecta (Dart, 1977).

Los nódulos de tipo indeterminado se caracterizan porque la división cortical se inicia en las células del córtex interno y presentan un meristemo apical persistente, además la forma de estos nódulos es ovalada. Ejemplos son los nódulos que se forman en especies de clima templado como *Medicago sativa*, *M. truncatula*, *Pisum sativum*, *Trifolium* spp., etc. (Hirsch, 1992).

Los nódulos de tipo determinado carecen de meristemo persistente, por lo que su forma es esférica, y las divisiones celulares se presentan en las células corticales de las capas externas del córtex de la raíz; entre los nódulos determinados destacan los que se forman en especies tropicales y subtropicales como son *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Lotus japonicus*, *Vigna radiata*, etc. (Hirsch, 1992).

1.10 El pelo radical en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Los pelos radicales son extensiones tubulares de células epidermales que se producen en la zona de diferenciación tanto de la raíz primaria como de las raíces laterales de la mayoría de las plantas angiospermas. Sus principales funciones son incrementar el área de contacto de la raíz con el suelo y constituir una interfase donde se llevan a cabo funciones de absorción de agua y nutrientes del suelo.

Al igual que las hifas de hongos, las células fucoides y los tubos polínicos, los pelos radicales mantienen una forma cilíndrica y un crecimiento polar, unidireccional, muy definido (Herman y Lamb, 1992) (Fig. 5); las células de donde surgen no se dividen y los pelos radicales están aislados entre sí y del resto de la raíz. Bajo condiciones de laboratorio los pelos radicales crecen favorablemente y son fácilmente visibles al microscopio, además por su disposición y forma son excelentes modelos celulares para el estudio del efecto de factores extracelulares (elicitores, hormonas, factores Nod, etc.), sobre su patrón de crecimiento, expresión de genes, organización subcelular, y otros aspectos de crecimiento y diferenciación celular en el contexto de la plasticidad del desarrollo de la raíz. Desde el punto de vista de biología celular, los pelos radicales son particularmente interesantes ya que la parte apical, conocida como la zona clara, está libre de organelos pero contiene una alta densidad y motilidad de vesículas (Campanoni y Blatt, 2007).

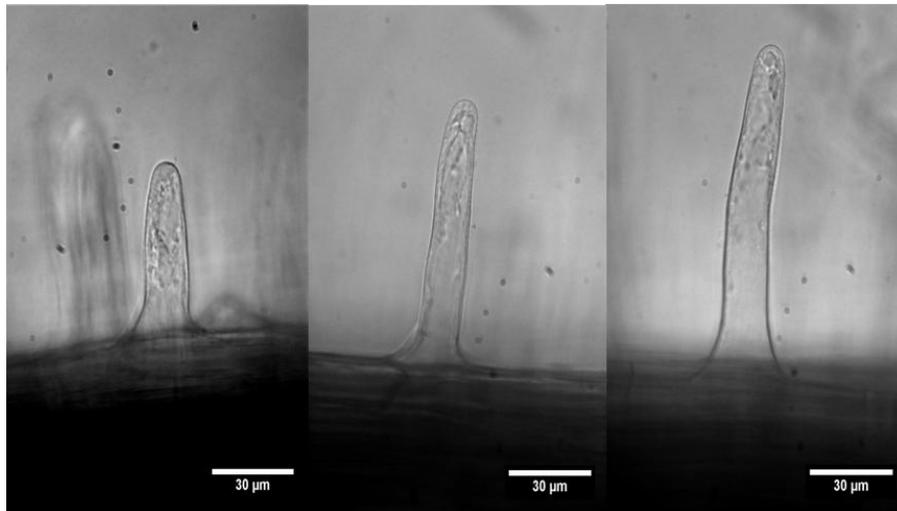


Fig. 5 Micrografía de pelos radicales vivos de frijol en crecimiento, sin inoculación con microsimbionte. Tomada de tesis de licenciatura de Dávila, R., 2009.

Gran parte de la información que actualmente se tiene acerca del desarrollo de los pelos radicales se ha generado al estudiar la raíz de *Arabidopsis thaliana*. En este modelo, de manera general, los tricoblastos (células epidermales que dan origen a los pelos radicales) y los atricoblastos (células epidermales que no dan origen a pelos radicales) están alternados a lo largo de la superficie de la raíz (Dolan *et al.*, 1994), dando casi por lo regular un patrón celular simple e invariante. El análisis de mutantes afectadas en el crecimiento y/o diferenciación de los pelos radicales ha revelado mecanismos intrínsecos de información posicional, regulación epigenética y señalización celular en la especificación del destino celular (Guimil y Dunand, 2006). Es importante mencionar que se sugiere que estos mecanismos son similares en otras plantas pero los estudios que sustentan esta hipótesis son aún muy escasos (Dolan *et al.*, 1994). En su conjunto, estos datos han permitido describir las etapas de desarrollo de los pelos radicales de *A. thaliana*, de la siguiente manera:

- 1) La especificación de las células que producirán pelos radicales está determinada por la posición de la célula con respecto a las células corticales, es decir, el tricoblasto está en contacto directo con dos células corticales, mientras que el atricoblasto sólo está en contacto con una (Dolan y Costa,

2001). Además se han identificado varios reguladores transcripcionales que inducen la diferenciación como CPC (Wada *et al.*, 1997), TRY (Schellmann *et al.*, 2002), ETC1 (Kirik *et al.*, 2004) y CLP3 (Tominaga *et al.*, 2008) y otros que evitan la diferenciación como WEREWOLF (Lee y Schiefelbeid, 1999), GL3, EGL3 (Payne *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), y TRANSPARENT TESTA GLABRA (Galway *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1999).

- 2) La iniciación del crecimiento del pelo radical se establece cuando se determina el sitio de polaridad del tricoblasto. Se presenta migración del núcleo hacia el centro del tricoblasto, y después hacia la base del pelo en desarrollo (revisado por Carol y Dolan, 2002). También se presenta una acidificación local en la pared celular (en el sitio determinado de polaridad) y una alcalinización del citoplasma adyacente a este sitio. Hay adelgazamiento y relajación de la pared celular que conduce a la formación de una protuberancia que definirá la polaridad celular. Establecer la zona apical de la protuberancia es un proceso lento, comparado con la rápida elongación del pelo radical (Carol y Dolan, 2002).
- 3) El crecimiento del pelo radical se distingue por la organización polarizada del citoplasma, es decir, rápida exocitosis en membrana plasmática en la zona apical y la migración del núcleo hacia la zona basal del pelo en crecimiento (Carol y Dolan, 2002). Además se mostró que la señalización hormonal, el flujo de iones y rearrreglos del citoesqueleto son importantes para el mantenimiento del crecimiento polar en el pelo radical (Guimil y Dunand, 2006; ver revisión más detallada por Ishida *et al.*, 2008).

Otra característica importante es que los pelos radicales presentan un crecimiento oscilatorio similar al reportado en tubos polínicos (Monshausen *et al.*, 2007 y 2008). Es interesante hacer notar que cambios en el pH extracelular y la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés) presentan niveles significativamente altos durante el crecimiento oscilatorio del pelo radical. Además se conoce que la producción y acumulación de ROS regula la homeostasis de calcio a través de la modulación de canales permeables de

calcio (Foreman *et al.*, 2003). El rearrreglo en la distribución de los microfilamentos de actina durante el crecimiento de pelos radicales en *A. thaliana* se visualizó por medio de estrategias de expresión de una quimera tipo GFP-actina, como marcador de distribución de actina (Baluska *et al.*, 2000).

1.11 El pelo radical de leguminosas.

Los pelos radicales se han estudiado en varias plantas leguminosas con principal énfasis en la simbiosis con rizobia, debido a que el inicio de la interacción se da en el pelo radical.

En *Medicago truncatula*, se estudió la citoarquitectura del pelo radical (Heidstra *et al.*, 1997) y las respuestas morfológicas y celulares de los pelos radicales a la percepción de los factores Nod (Ramos y Bisseling, 2003). Debido a la dificultad para aislarlos de la raíz, la bioquímica del pelo radical había sido poco abordada, por lo que en *M. truncatula* se desarrolló un método altamente eficiente de aislamiento por congelación de la raíz en nitrógeno líquido; los pelos radicales son separados de la raíz con un pincel, colectándose en nitrógeno líquido y después son procesados (Ramos y Bisseling, 2003). En este trabajo se analizó la proteína RH2, altamente específica de los pelos radicales. En otro trabajo, el proceso de infección (formación y crecimiento del hilo de infección) por *Sinorhizobium meliloti* en pelos radicales de *M. truncatula* se visualizó mediante microscopía confocal con diferentes marcadores; también pudieron identificar varios componentes que juegan un papel activo en el desarrollo del hilo de infección (Fournier *et al.*, 2008).

Los pelos radicales de *Lotus japonicus* se han estudiado en el contexto de la simbiosis con *Bradyrhizobium japonicus* utilizando un enfoque proteómico. Wan y colaboradores (2005), también publicaron un método fácil de aislamiento y purificación de pelos radicales, éste método toma como base el publicado por Ramos y Bisseling, 2003, pero con una modificación, en vez de cosechar los pelos radicales con un pincel, éstos se separan de la raíz con agitación constante

favoreciendo que por ruptura mecánica se separen los pelos radicales de la raíz. Gracias a que los pelos radicales de *L. japonicus* son de tamaño relativamente grande, les permitió contar con cantidades suficientes de proteína. Sus resultados muestran dos proteínas aparentemente específicas de pelos radicales (quitinasa de clase I y gen de inducción por estrés H4) y 20 proteínas aparentemente más abundantes en los pelos radicales que en el resto de la raíz, entre las cuales están la lipoxigenasa, la fenilalanina-amonio liasa, fosfolipasa D y una fosfoglucomutasa. En un trabajo más reciente, Brechenmacher y colaboradores (2009), identificaron cerca de 1,492 proteínas en extractos de pelos radicales infectados de soya, las más relevantes son 3 proteínas con probable actividad fosfatasa y 7 proteínas con probable actividad cinasa, una de ellas se anotó como un receptor cinasa que podría participar en la percepción de estímulos externos. Sin embargo, en este estudio no se encontraron los receptores tipo cinasas SymRK, NFR1 y NFR5 (u ortólogos) los cuales participan en la simbiosis (ver más adelante); no se excluye que este resultado esté probablemente asociado a una baja abundancia relativa de estos receptores en pelos radicales.

1.12 El pelo radical de frijol.

En frijol, los pelos radicales han sido poco estudiados con respecto a otras plantas leguminosas. Nuestro grupo de trabajo ha sido uno de los pioneros en aportar información sobre las respuestas asociadas a la percepción de los factores Nod como la deformación del pelo radical, la formación del hilo de infección, cambios en la concentración de calcio apical (Cárdenas *et al.*, 2006) y la visualización de microfilamentos de actina (mediante la microinyección de faloidina fluorescente en pelos radicales; Cárdenas *et al.*, 1998). Por otra parte se determinó una acumulación localizada de ROS en el ápice del pelo radical y un aumento en su concentración intracelular cuando se adicionan factores Nod, lo que parece inducir los cambios en la concentración de calcio, subrayando la conexión entre ROS y calcio (Cárdenas *et al.*, 2008). Por último se ha mostrado que en pelos radicales de frijol el ATP celular es capaz de inducir cambios en ROS (Cárdenas *et al.*,

2008), como se ha reportado en *A. thaliana* y *M. truncatula* (Song *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Roux y Steinebrunner, 2007).

1.13 Biología molecular de la nodulación.

Por su complejidad molecular y para fines prácticos, el proceso simbiótico se ha dividido en dos grandes etapas: la etapa temprana, que comprende el diálogo molecular e intercambio de señales entre el pelo radical y la bacteria, el proceso de infección (formación y elongación del hilo de infección, infección de células corticales, etc.) y la formación del primordio de nódulo. La etapa tardía corresponde a la organogénesis (formación del nódulo, haces vasculares, etc.) y funcionalidad del nódulo (fijación de nitrógeno) (Oldroyd *et al.*, 2011). Es importante puntualizar que, si bien el número de genes y proteínas identificados va en aumento, en su mayoría no se conoce su función biológica. Además la mayor parte de los eventos moleculares que se suceden a lo largo de todo el proceso de nodulación permanecen en espera de ser caracterizados.

1.14 Percepción de los factores Nod.

La estrategia que condujo a la identificación de los receptores de los factores Nod está basada en el estudio de mutantes de la leguminosa modelo *L. japonicus* con fenotipo de nodulación menos (*nod⁻*), incapaces de inducir las respuestas típicas asociadas a la percepción de los factores Nod. Con esta estrategia se identificaron dos genes, *LjNfr1* y *LjNfr5* (*n*od *f*actor *r*eceptor, por sus siglas en inglés) en *L. japonicus* (Madsen *et al.*, 2003) y posteriormente se identificaron los ortólogos de estos receptores en *Pisum sativum* (*Sym2A* y *Sym10*), *M. truncatula* (*MtLyk3/MtLyk4* y *MtNfp*) y en *Glycine max* (*GmNfr1 α/β* y *GmNfr5 α/β*) (Limpens *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006; Indrasumunar, 2007; Indrasumunar *et al.*, 2009). Los genes *LjNfr1*, *LjNfr5* y ortólogos codifican para proteínas cuya estructura primaria comprende un dominio intracelular, muy conservado, característico de cinasas tipo serina-treonina, una región

transmembranal y una región extracelular con dominios tipo LysM (Madsen *et al.*, 2003). Este tipo de proteínas membranales con dominios LysM y dominio cinasa se han encontrado sólo en plantas (Gough, 2003). La función de los dominios tipo LysM ha sido ampliamente estudiada en proteínas tipo LysM de la pared celular de bacterias (*Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, entre otros) y de algunas levaduras como *Kluyveromyces lactis* (Bateman y Bycroft, 2000; Guillaume *et al.*, 2008). Dicha función está asociada a su actividad de unión a peptidoglicanos y a cierta especificidad por glicanos que contienen residuos GlcNac, por ejemplo quitina (Mulder *et al.*, 2006). Es interesante hacer notar que quitina es un oligosacárido cuya estructura química es muy similar a la del esqueleto LCO de los factores Nod (Oldroyd y Downie, 2004). De donde se postula que los dominios tipo LysM de *LjNFR1* y *LjNFR5* son los mediadores de la percepción específica de los factores Nod compatibles en *L. japonicus* (Oldroyd y Downie, 2004). La especificidad de *LjNFR1* y *LjNFR5* por los factores Nod se confirmó en experimentos de expresión heteróloga de estos receptores en *M. truncatula*. Las plantas transformadas fueron capaces de nodular por *Mesorhizobium loti*, el simbionte de *L. japonicus*, mientras que plantas tipo silvestres de *M. truncatula* no pueden ser infectadas por esta bacteria, lo que sugiere que *LjNFR1* y *LjNFR5* actúan coordinadamente y que sus dominios extracelulares LysM son responsables del reconocimiento específico de los factores Nod producidos por *M. loti* (Radutoiu *et al.*, 2007). El análisis de las proteínas mostró que *LjNFR1* y ortólogos contienen un dominio cinasa activo, mientras *LjNFR5* presenta el dominio cinasa inactivo (Madsen *et al.*, 2003). Estos datos, junto con experimentos de sobreexpresión de los receptores en *N. benthamiana*, indicaron que *LjNFR1* y *LjNFR5* forman un complejo que se requiere para la activación de la transducción de señales desencadenada por los factores Nod (Madsen *et al.*, 2011). Se sabe que *LjNFR1* es capaz de autofosforilarse y de transfosforilar a *LjNFR5* *in vitro* (Madsen *et al.*, 2011; Klaus-Heisen *et al.*, 2011). Además el dominio cinasa de *LjNFR1* parece tener reconocimiento intracelular específico. En experimentos de nodulación de *L. japonicus* con su simbionte, donde este dominio se reemplazó por el dominio cinasa tipo serina/treonina de otro receptor intracelular CERK1, no se observó infección con rhizobia, ni desarrollo del

nódulo (Nakagawa *et al.*, 2011).

1.15 Transducción de señales.

El modelo molecular actual sobre la etapa del inicio de la interacción leguminosa-rhizobia propone que la percepción de los factores Nod se transduce en la activación del dominio cinasa del complejo NFR1/NFR5, lo que a su vez conduce a la activación de una cascada de señalización en el interior del pelo radical e inducción de la transcripción de una batería de genes, algunos asociados a funciones de regulación de la expresión génica (Oldroyd y Downie, 2008). Se han identificado pocos blancos de los intermediarios en la cascada de señalización (Fig. 6), y de otros sólo se dispone de la descripción fenotípica de mutantes deficientes en alguna de las respuestas típicamente inducidas por los factores Nod, esto ha permitido definir un orden cronológico en el que se presentan tales respuestas (Oldroyd y Downie, 2008).

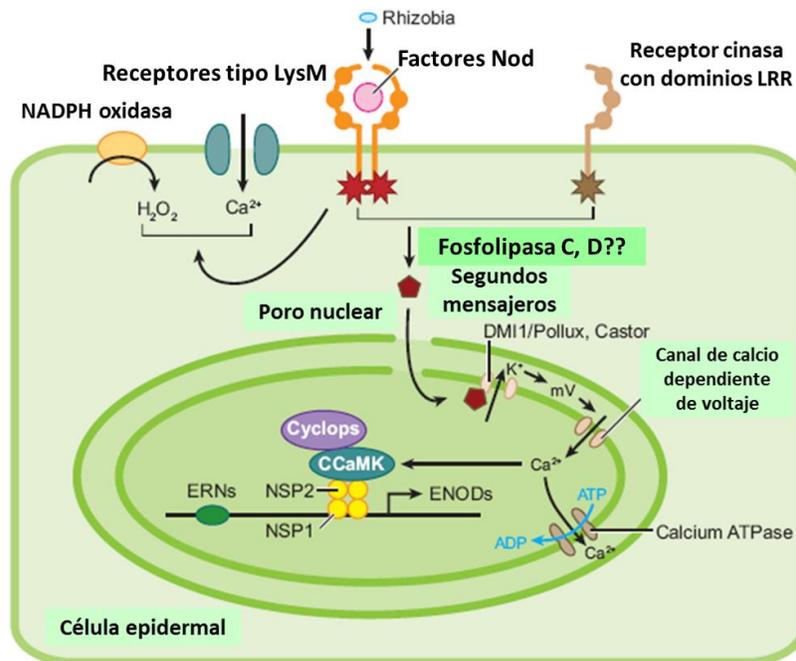


Fig. 6 Modelo de la señalización inducida por los factores Nod en una célula epidermal. El modelo actual propone que, la percepción de los factores Nod por los receptores tipo cinasa LysM, conduce a la activación del receptor cinasa con

dominios LRR, y a una subsecuente cascada de señalización (con blancos intermediarios no identificados) en el pelo radical, que involucra influjo del Ca^{2+} extracelular por medio de canales iónicos y a oscilaciones de Ca^{2+} , reportadas en el núcleo. Éstas oscilaciones de calcio podrían activar la proteína cinasa nuclear dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK), la cual a su vez activaría a los reguladores transcripcionales tipo GRAS, NSP1 y NSP2 y así inducir la transcripción de genes involucrados en la nodulación. Esquema tomado y modificado de Oldroyd y Downie, 2008.

De manera general, se postula que con la activación de los receptores de los factores Nod se activa el receptor tipo cinasa con dominios LRR (ver mas adelante) conduciendo a la transducción de una señal secundaria (con segundos mensajeros no identificados) desde la membrana celular hasta el núcleo, culminando en oscilaciones de calcio en las regiones nuclear y perinuclear. Se ha determinado que estas oscilaciones son decodificadas por una cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK, también conocida como DMI3 en *M. truncatula*) localizada en el núcleo (Mitra *et al.*, 2004). A su vez, CCaMK interactúa con *LjCYCLOPS* (en *L. japonicus* u ortólogo *MtIPD3* en *M. truncatula*; Yano *et al.*, 2008; Messinese *et al.*, 2007) lo que promueve la activación de varios factores de transcripción: NSP1 (Smit *et al.*, 2005), NSP2 (Kalo *et al.*, 2005), ERN (“factor repressor Ets2” o ERF; Middleton *et al.*, 2007) y NIN (“nodule inception”; Schauser *et al.*, 1999; Borisov *et al.*, 2003). Esta serie de interacciones conduce a la expresión de proteínas denominadas nodulinas tempranas (ENOD’s), involucradas en las respuestas morfológicas en el pelo radical y en la zona del córtex, antes mencionadas (Fig. 6). Se identificaron otras proteínas cuyo papel durante la nodulación aún no se ha descifrado por completo, pero que se sabe actúan río arriba de las oscilaciones de calcio. Entre ellas se encuentran dos nucleoporinas codificadas por *LjNup133* y *LjNup85* (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007) y proteínas que forman parte de canales de potasio en la membrana nuclear, POLLUX y CASTOR (Charpentier *et al.*, 2008) en *L. japonicus*.

1.16 Nodulinas.

Las proteínas codificadas por genes cuya expresión está asociada específicamente al proceso de nodulación son llamadas nodulinas y se clasifican en tempranas y tardías, con base en su expresión temporal a lo largo de la nodulación (Dehio y de Bruijin, 1992). En general, la expresión de nodulinas tempranas está asociada a las respuestas inducidas por los factores Nod en los pelos radicales, por ejemplo deformación del pelo radical, inicio de la infección, formación y elongación del hilo de infección, división de células corticales y formación del primordio de nódulo. Ejemplos de nodulinas tempranas incluyen a ENOD2, ENOD5, ENOD10, ENOD11, ENOD12, ENOD40, PRP4 y GRP, (Dehio y de Bruijin, 1992). En cambio, la expresión de nodulinas tardías se induce durante la etapa donde el bacteroide lleva acabo la fijación de nitrógeno (10-21 dpi). Entre las nodulinas tardías se pueden citar a leghemoglobina, uricasa II y sacarosa sintasa, entre otras (Dehio y de Bruijin, 1992).

2.- ANTECEDENTES.

El presente trabajo se enfoca en el estudio del receptor SymRK (receptor tipo cinasa con dominios repetidos ricos en leucina o RLK-LRR, por sus siglas en inglés) de frijol, uno de los receptores que participan en la cascada de transducción de señales desencadenadas en el pelo radical de leguminosas después de la percepción de los factores Nod.

2.1 Receptores tipo RLK-LRR.

Los receptores RLK-LRR constituyen una familia muy grande de proteínas, presentes tanto en plantas como en animales y cuyas funciones están relacionadas con la percepción de patógenos (sistema inmune o de defensa), con vías de señalización y desarrollo de brotes en plantas (Oldroyd y Downie, 2004; Spalink, 2002), por mencionar algunas. Si bien un gran número de genes (216 en *A. thaliana*; Diévert y Clark, 2004) que codifican para este tipo de receptores están presentes en el genoma de las plantas, las funciones biológicas de la mayoría aún no se han descifrado (Diévert y Clark, 2004). Este tipo de receptores posee en su amino terminal un péptido señal, un dominio extracelular que contiene motivos repetidos ricos en leucina (LRR) cuya secuencia consenso es tipo LxxLxxLxxLxLxxNxLxGxIPxx, una región transmembranal y un dominio cinasa intracelular, con actividad cinasa tipo serina-treonina (Hanks y Quinn, 1991; Kobe y Deisenhofer, 1994; Afzal *et al.*, 2008). Estos receptores se clasifican en 13 subfamilias (LRR I-XIII) dependiendo del número de dominios de LRR en el dominio extracelular (Shiu y Bleecker, 2002). El papel de los RLK-LRR se ha estudiado con la ayuda de varias plantas mutantes cuyo fenotipo muestra que juegan un papel en diversos procesos tales como el desarrollo de la planta (diferenciación de meristemas, desarrollo de endospermo, óvulos, polen, inducción de floración, percepción de brasinosteroides, etc.), en el reconocimiento de patógenos y también en la interacción leguminosa-rhizobia (Tabla1).

Tabla 1. Funciones de RLK-LRR en plantas.

Proceso	Gen	Función	Planta	Referencia
Desarrollo	CLAVATA1 (CLV1)	Diferenciación del meristemo	<i>Arabidopsis</i>	Clark <i>et al.</i> , 1997
	Receptor de fitosulfocina (receptor PSK)	Unión de hormona peptídica	Tomate	Matsubayashi <i>et al.</i> , 2002
	ERECTA (ER)	Forma general de la planta	<i>Arabidopsis</i>	Torii <i>et al.</i> , 1996
	Receptor cinasa Ipomocea nil (INRPK1)	Inducción floral de fotoperiodo corto	<i>Ipomocea nil</i>	Bassett <i>et al.</i> , 2000
	HAESA/RLK5	Abscisión de órganos florales	<i>Arabidopsis</i>	Jinn <i>et al.</i> , 2000
	EMS1/EXS	Desarrollo del endospermo y polen	<i>Arabidopsis</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2002
	Receptor somático de embriogénesis 1 (<i>AtSERK1</i>)	Desarrollo del ovulo y embriogénesis temprana	<i>Arabidopsis</i>	Hecht <i>et al.</i> , 2001
	BRI1/BAK1	Percepción de brasinosteroides	<i>Arabidopsis</i>	Li y Chory, 1997
	VH1	Patrón de hojas	<i>Arabidopsis</i>	Clay y Nelson, 2002
	Receptor de sistemina (SR160)/CURL3/tBRI1	Percepción de brasinosteroides y de sistemina	Tomate	Montoya <i>et al.</i> , 2002
Defensa	FLS2	Defensa de la planta/ reconocimiento de patógeno	<i>Arabidopsis</i>	Gomez-Gomez y Boller, 2000
	Xa21	Percepción de tipo fúngico	Arroz	Song <i>et al.</i> , 1995
Simbiosis	SYMRK/NORK/DMI2/Sym19	Formación del nódulo	<i>M. truncatula</i> , <i>P. sativum</i> , <i>L. japonicus</i> , <i>M. sativa</i> , <i>G. max</i> ,	Schneider <i>et al.</i> , 1999; Catoira <i>et al.</i> , 2000; Endre <i>et al.</i> , 2002; Stracke <i>et al.</i> , 2002; Capoen <i>et al.</i> , 2005;

			<i>Sesbania rostrata</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	Limpens <i>et al.</i> , 2005; Sánchez-López <i>et al.</i> , 2011
	Receptor cinasa de autoregulación de la nodulación (NARK/HAR1/SYM29/SUNN)	Autoregulación de la nodulación	<i>Glycine max</i> , <i>L. japonicus</i> , <i>P. sativum</i> y <i>M. truncatula</i>	Searle <i>et al.</i> , 2003; Krusell <i>et al.</i> , 2002; Nishimura <i>et al.</i> , 2002
	KLAVIER	Regulación sistémica negativa de la nodulación	<i>L. japonicus</i>	Miyazawa, <i>et al.</i> , 2010

2.2 La participación de SymRK (y ortólogos DMI2 y NORK) en la simbiosis.

Uno de los receptores que participa en las etapas tempranas de la simbiosis leguminosa-rhizobia es un receptor tipo RLK-LRR (Fig. 6). El gen que codifica para este receptor se ha identificado en varias plantas leguminosas. En *L. japonicus*, *Sesbania rostrata* y *P. vulgaris* se reporta como SymRK (por siglas en inglés de symbiosis receptor-like kinase), mientras que el ortólogo en *M. sativa* y en *Glycine max* se conoce como NORK (siglas en inglés nodule receptor kinase), en *M. truncatula* como DMI2 (siglas en inglés doesn't make infection 2) y en *P. sativum* como Sym19 (Schneider *et al.*, 1999; Catoira *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005; Limpens *et al.*, 2005; Sánchez-López *et al.*, 2011). Dada la diversidad en su nomenclatura, al referirme a este receptor utilizaré el nombre de SymRK, de manera general.

El papel funcional del SymRK en el desarrollo del nódulo se ha revelado mediante el análisis de mutantes defectuosas en la nodulación y el uso de herramientas moleculares tales como clonación de genes, experimentos de silenciamiento y sobreexpresión (Catoira *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005; Gherbi *et al.*, 2008; Markmann y Parniske, 2008). El análisis

de las raíces de mutantes en SymRK, inoculadas con su simbionte compatible, mostró que si bien no se presenta infección, se inducen algunas de las respuestas en el pelo radical provocadas por los factores Nod, tales como hinchamiento y ramificación del pelo radical, inducción de algunas nodulinas tempranas y rápido influjo de calcio. Estas respuestas indican que en las mutantes *symrk*, *nork* y *dmi2* los factores Nod se perciben dando una respuesta parcial (Schneider *et al.*, 1999; Catoira *et al.*, 2000; Wais *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005). Por otro lado, las mutantes no presentan respuestas en el pelo radical (encurvamiento y atrapamiento de la bacteria), ni formación de hilo de infección, ni división de células corticales, es decir, se interrumpe el programa de desarrollo del nódulo (Schneider *et al.*, 1999; Catoira *et al.*, 2000; Wais *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005).

Se analizó a nivel molecular, la expresión del mensajero de SymRK, encontrándose que el transcrito presenta una acumulación basal en raíz de la leguminosa no inoculada. El nivel del transcrito tiene un aumento aparente en raíces inoculadas con el simbionte compatible (tiempos tardíos *post*-inoculación), y también se detectó en nódulos. La incubación con factores Nod o la ausencia de nitrógeno, no indujo aumento del transcrito de SymRK en raíces (Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005; Bersoult *et al.*, 2005). La expresión espacio-temporal del promotor (3 Kb) de *MtDMI2*, en fusión transcripcional a la secuencia codificante de GUS (enzima β -glucuronidasa), fue evaluada en raíces transgénicas de *M. truncatula*. Los resultados mostraron que la actividad del promotor se encuentra en la epidermis (incluyendo pelos radicales) y en el córtex a lo largo de las zonas de elongación y diferenciación de la raíz. El ápice de la raíz no presentó señal de GUS por lo que los autores concluyeron que DMI2 no se expresa en esta parte de la raíz (Bersoult *et al.*, 2005).

La función de SymRK se ha analizado con apoyo de estrategias de genética reversa mediante la expresión heteróloga de RNA interferente (RNAi) cuyo blanco es el transcrito de SymRK, así como en estudios de sobreexpresión de este

receptor. Raíces transgénicas de *S. rostrata* que expresaban SrSymRK-RNAi no presentaron nódulos y en algunos casos, escasos *pseudo*-nódulos (estructuras pequeñas, blanquecinas tipo nódulo no maduro) que se analizaron por microscopia electrónica. El principal fenotipo observado fue el defecto en la formación del hilo de infección, es decir, presentaba una forma irregular con protuberancias y una pared celular con depósitos de material. También se observó que las bacterias que se encontraban en los hilos de infección no se liberaban al interior de las células corticales, y en consecuencia no se observaron simbiosomas (Capoen *et al.*, 2005). Resultados similares se obtuvieron al silenciar a DMI2 en raíces transgénicas de *M. truncatula* (Limpens *et al.*, 2005). La sobreexpresión ectópica del cDNA completo de DMI2, bajo el control del promotor 35S, en la mutante TR25 de *M. truncatula*, favoreció la formación del hilo de infección, si bien con un diámetro incrementado y una extensiva ramificación, pero no se observaron simbiosomas indicando que la regulación de la expresión espacio-temporal se requiere para rescatar completamente el fenotipo tipo silvestre (Limpens *et al.*, 2005). Así que, para obtener mejores resultados, expresaron el gen completo de DMI2 fusionado a GFP y bajo el control del promotor endógeno de *MtDMI2* (1.7Kb), en la misma mutante TR25. Los resultados indicaron completo restablecimiento del fenotipo tipo silvestre, con extensivo crecimiento del hilo de infección. En nódulos, se observó la localización subcelular DMI2-GFP en la membrana celular de las células corticales y en la membrana que rodea el hilo de infección, sugiriendo una función directa de DMI2 en la internalización de la rhizobia dentro de las células corticales (Limpens *et al.*, 2005).

Siendo SymRK un receptor transmembranal, se ha realizado la búsqueda de interactores del dominio cinasa intracelular, lo que ha llevado a la identificación de posibles candidatos, entre ellos se han reportado: remorinas, *MtHMGR* (3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima a reductasa1) y una proteína tipo ARID con motivo de unión a DNA, *LjSIP1* (Kevei *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008; Lefebvre *et al.*, 2010). Sin embargo, entender su relación funcional con SymRK es aún un reto. Respecto

a la posible interacción de la región extracelular (dominios LRR) con ligandos es una pregunta que aún no ha sido explorada.

Más allá de sus funciones claves en la nodulación, SymRK es también un receptor necesario en interacciones simbióticas entre plantas vasculares y *Glomus intraradices*, para formar asociaciones micorrizicas arbusculares (AM) y entre angiospermas no leguminosas y actinobacterias para formar nódulos actinorrhizales (Gherbi *et al.*, 2008, Markmann y Parniske, 2008).

2.3 *PvSymRK* en *Phaseolus vulgaris*.

La identificación y caracterización del receptor *PvSymRK* en *P. vulgaris* se reportó recientemente por nuestro grupo de trabajo, encabezado por la Dra. Carmen Quinto Hernández (Sánchez-López *et al.*, 2011). El cDNA del *PvSymRK* codifica para una proteína transmembranal de 919 residuos, con una masa molecular teórica de 103.2 KDa y una identidad de secuencia peptídica del 78%, 82% y 78% con sus ortólogos *MtDMI2*, *LjSYMRK* y *MsNORK*, respectivamente (Sánchez-López *et al.*, 2011). La estructura primaria de *PvSymRK* es similar a la de sus ortólogos, es decir, el extremo *N*-terminal presenta una secuencia tipo péptido señal (indicativo de tránsito por la vía secretoria) y una región extracelular de 438 residuos, que contiene tres regiones ricas en leucina localizadas hacia la parte transmembranal de la proteína. En el extremo *C*-terminal esta el dominio cinasa que comprende 328 residuos orientados hacia el entorno intracelular (Fig. 7).

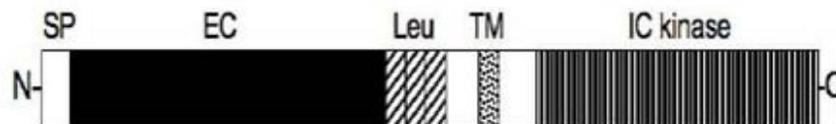


Fig. 7 Estructura primaria de *PvSymRK*. SP, péptido señal; EC, dominio extracelular; Leu, repetidos ricos en leucina; TM, región transmembranal; IC, dominio cinasa intracelular. Tomada de Sánchez-López *et al.*, 2011.

El análisis de *PvSymRK* en frijol mostró expresión del mensajero en raíces y nódulos, más no en otros tejidos como tallos y hojas. También se observó expresión constitutiva del receptor en raíces sin inocular y a lo largo del proceso simbiótico (Sánchez-López *et al.*, 2011). En experimentos de silenciamiento (por RNAi), en raíces transgénicas de frijol que expresan un RNAi dirigido contra el transcrito *PvSymRK* e inoculadas con *R. etli* se encontró que en la mayoría de los casos no hay formación de nódulos, en otros casos una disminución significativa en el número de nódulos y en otros más solo se encontraron unas estructuras *pseudo*-nódulos en las raíces silenciadas, comparadas con las raíces de plantas tipo silvestres. En cortes histológicos de las escasas estructuras *pseudo*-nódulos, se observó que no hay células infectadas y que los haces vasculares están localizados ectópicamente en lugar de en la periferia del nódulo (Sánchez-López *et al.*, 2011).

Con el fin de generar herramientas para el estudio de la distribución y función de *PvSymRK* en frijol, se generaron anticuerpos policlonales dirigidos contra el extremo extracelular de *PvSymRK* (anticuerpos *anti-PvSymRK*). En ensayos tipo Western blot utilizando un extracto total de proteínas de nódulos de 15 dpi y de raíces, estos anticuerpos reconocen un doblete de ~100 y 110 KDa, respectivamente. La detección del doblete pudiera estar reflejando modificaciones *post*-traduccionales; esta interpretación se basa en los resultados de fosforilación *in vitro* del dominio intracelular de *LjSymRK* (Yoshida y Parniske, 2005) y la presencia de posibles sitios de *N*-glicosilación en la estructura primaria de *PvSymRK*. Por otro lado, estos anticuerpos permitieron la detección de *PvSymRK*, por inmunofluorescencia indirecta, en raíz y a lo largo del proceso de nodulación. Este análisis mostró que, en raíz, *PvSymRK* se localiza principalmente, en el cilindro central y en las células de la epidermis. La presencia de *PvSymRK* en la epidermis se sostiene durante la formación del primordio de nódulo (3 dpi). En tiempos más tardíos durante la organogénesis del nódulo (6, 10, 12, 15 y 20 dpi), la proteína se encuentra en las células del córtex interno del nódulo, así como en las células no infectadas del tejido central del nódulo. *PvSymRK* también se

expresa a lo largo del desarrollo de los haces vasculares del nódulo (Sánchez-López *et al.*, 2011).

En suma, el análisis de su expresión y funciones biológicas indica que el receptor SymRK (y ortólogos) juega un importante papel en la infección y la organogénesis del nódulo simbiótico. Principalmente en la formación y crecimiento del hilo de infección, que surge a partir de una invaginación de la membrana plasmática de los pelos radicales, y en la liberación de las bacterias del hilo de infección hacia las células corticales. Sin embargo, la distribución celular y blancos e interactores de SymRK en estos eventos ha recibido poca atención y permanecen por ser estudiados.

3.- HIPÓTESIS.

Dado que la formación y crecimiento del hilo de infección se inicia en el pelo radical y requiere de la expresión del receptor SymRK, se postula que este receptor se inserta en la membrana plasmática de pelos radicales de frijol y su distribución se modifica en respuesta a la incubación con factores Nod.

4.- OBJETIVO.

4.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de los factores Nod sobre la distribución del receptor quimérico *PvSymRK-GFP* en pelos radicales de frijol.

4.2 Objetivos específicos:

1. Analizar la expresión del receptor *PvSymRK* en pelos radicales de plántulas de frijol de diferentes edades (2, 3, y 4 días *post-germinación*) por medio de Western blot.
2. Generar raíces transgénicas de frijol que expresen un cDNA quimérico *PvSymRK-GFP*, que codifica para una fusión traduccional entre el receptor *PvSymRK* y la proteína fluorescente GFP, bajo el control del promotor 35S.
3. Analizar, por microscopía de epifluorescencia, el efecto de la incubación con factores Nod sobre la distribución del receptor quimérico *PvSymRK-GFP* en los pelos radicales de raíces transgénicas de frijol.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Germinación de semillas de frijol variedad Negro Jamapa. Las semillas se esterilizan con etanol al 70% durante un minuto y cloro (solución de hipoclorito de sodio 5%) al 20% durante 5 min, con lavados (intermedios y finales) con agua destilada estéril. La germinación se realiza en charola estéril sobre un papel absorbente humedecido con medio Fähræus líquido (CaCl_2 90 mM, MgSO_4 58.8 mM, KH_2PO_4 73 mM, Na_2HPO_4 1.08 mM, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 204 mM, Trazas Gibson: MnSO_4 120 μM , ZnSO_4 76.5 nM, H_3BO_3 460 μM , CuSO_4 32 nM, H_2MoO_4 38.8 nM), y se cubre con papel aluminio. Las semillas se colocan en una misma orientación y la charola se inclina levemente para favorecer que la raíz se desarrolle recta. La incubación se realiza a 28°C por 48 horas en oscuridad.

5.2 Aislamiento de pelos radicales. El método de aislamiento de pelos radicales se basa en el protocolo reportado en la página web www.plantsci.missouri.edu/staceylab/. Brevemente, se sostiene la plántula con una pinza y, con ayuda de unas tijeras, se realiza un primer corte a aproximadamente 5 mm del ápice de la raíz y un segundo corte en la base del tallo de la plántula; dependiendo de la edad de la plántula el tamaño de la raíz varía, por ejemplo, plántulas de 2 dpv es de 3 a 4 cm, plántulas de 3 dpv es de 4 a 5 cm y plántulas de 4 dpv es de 5 a 6 cm de raíz completa. Los tejidos se colectan directamente en nitrógeno líquido, y en agitación constante si se trata de la raíz, a manera de que los pelos radicales se separen de la raíz por ruptura mecánica; a continuación se pasa la suspensión de tejido en nitrógeno líquido a través de un colador (utensilio de cocina) que retiene las raíces rasuradas (sin pelos radicales), mientras que los pelos radicales se recuperan por evaporación del nitrógeno filtrado. Las muestras de tejido se guardan a -80°C hasta ser procesadas. Es importante trabajar con extrema precaución para evitar, en la medida de lo posible, cualquier tipo de estrés en la plántula, siendo los pelos radicales células muy sensibles a manipulación o a cambios bruscos, que desencadenan estrés y una posible alteración de la bioquímica del pelo radical.

5.3 Extracción de RNA a partir de pelos radicales y expresión génica por RT-qPCR.

Se extrae ARN total de las muestras previamente congeladas de pelos radicales, ápices, raíz rasurada y raíz completa con TRIZOL (SIGMA), siguiendo las indicaciones del distribuidor. La integridad del ARN se verifica en un gel de agarosa mediante electroforesis y su concentración se determina en NanoDrop (Thermo Scientific 2000c). La contaminación de ADN genómico se elimina con DNAsa libre de RNAsa (1 unidad/ μ l Roche) durante 15 min a 37°C; la DNAsa se inactiva al incubar las muestras por 10 min a 65°C. Para corroborar la ausencia de ADN genómico en las muestras de ARN, éstas se utilizan como templado para un ensayo de PCR (ver sección 5.8) semi-cuantitativo y el producto del PCR se verifica en gel de agarosa por electroforesis. Las muestras de ARN libres de contaminación con ADN se utilizan para los ensayos de RT-qPCR con el kit iScript™ One-step RT-PCR Kit with SYBR® 192 Green (BioRad), siguiendo las instrucciones del distribuidor en un termociclador iQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio-Rad). Cada reacción de RT-qPCR se realiza con 40 ng (10ng/ μ l) de ARN como templado. Para confirmar la ausencia de ADN genómico en el ensayo, se incluye una reacción sin transcriptasa reversa. La expresión relativa de cada uno de los genes en estudio se calcula con la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde $Ct = Ct$ del gen de interés menos el Ct del gen de referencia. Como gen de referencia se emplea al factor de elongación EF1 α (Blanco *et al.*, 2009). Los oligonucleótidos específicos se diseñan de acuerdo a las recomendaciones del distribuidor del Kit SYBR® 192 Green (BioRad); oligonucleótidos de *PvSymRK*: *PvSymRK*-RTUp, 5'-GAATTCTATGATGGAATTACCAGAAATTTGGG-3' y *PvSymRK*-RTLw: 5'-CTGGCTTTGCAACTGAAGGG-3'; oligonucleótidos del factor de elongación EF1 α : *PvEF1a*-RTUp, 5'-GGTCATTGGTCATGTCGACTCTGG-3' y *PvEF1a*-RTLw 5'-GCACCCAGGCATACTTGAATGACC-3'. 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.

5.4 Extracción de proteínas a partir de pelos radicales. Los pelos radicales, colectados y congelados según se describe en el inciso 5.2, se procesan de la siguiente manera: ~100 mg de pelos radicales (de 70-90 plántulas), se resuspenden directamente en 0.5 ml de buffer de extracción (40 mM TrisHCl pH 7.4, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas: 1 mM de PMSF (Fenilmetilsulfonyl fluoruro, Sigma-Aldrich) y 1.4 mg/ml de Cocktail de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Para eliminar cuerpos fenólicos, al buffer de extracción se le añade PVPP (polivinilpolipirrolidona, Sigma) 20 mg/ml. La mezcla de extracción se homogeniza vigorosamente con ayuda de vórtex durante 20 min a 4°C y se centrifuga a 20200 g usando micrófuga a 4°C durante 20 min. Las proteínas contenidas en el sobrenadante resultante se precipitan inmediatamente (ver inciso 5.5), alternativamente, el sobrenadante puede guardarse a -80°C.

5.5 Precipitación de proteínas con cloroformo-metanol. Se mezcla un volumen de suspensión de proteínas (1 ml) con 4 volúmenes de metanol 100%, y se agita por inversión. Posteriormente, se añade un volumen de cloroformo 100%, y se agita por inversión. Se añaden 3.2 volúmenes de agua destilada estéril y se centrifuga a 20200 g en micrófuga a temperatura ambiente durante 2 min, esto genera una interfase que contiene las proteínas. Se descarta la fase superior y se conserva la fase inferior más la interfase. Se añaden 4 volúmenes de metanol y se agita por inversión. Se centrifuga a 20200 g en micrófuga a temperatura ambiente durante 15 min y se decanta. La pastilla se deja secar y se resuspende directamente en buffer de carga para SDS-PAGE 1X (10% Glicerol, 2.5% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% β -mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol) en presencia de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche), seguido de desnaturalización por calor a 100°C durante 10 min. La muestra puede conservarse a -20°C hasta su análisis.

5.6 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas de las muestras, resuspendidas y desnaturalizadas como se indica en el inciso 5.5, se separan por electroforesis vertical, bajo el principio de separación de macromoléculas por el método de Laemmli (gel concentrador: 4% poliacrilamida, con relación acrilamida-bisacrilamida 30:0.8, y 0.4% SDS; y gel separador: 8%, 10% ó 12% de poliacrilamida, según el caso, misma relación acrilamida-bisacrilamida y 0.4% SDS). La electroforesis se realiza en un sistema Miniprotean III (BioRad) y corriente constante (gel concentrador, 16 mA; gel separador, 26 mA) en buffer de corrida (0.25 M Tris Base, 1.91 M glicina, 1% SDS, pH 8.3). Según lo requiera el experimento, las proteínas en el gel se tiñen con solución de tinción (25% isopropanol, 10% ácido acético y 0.2% azul de Coomassie R250) durante 6 horas (h) y, posteriormente, se destiñen con solución de ácido acético 10% e isopropanol 10% durante 10 h en agitación constante, o bien se electrotransfieren a membrana de nitrocelulosa. Para ensayos tipo Western blot, la electroforesis incluye un marcador de peso molecular de proteínas preteñidas (Prestained Protein Marker Broad, Fermentas).

5.7 Análisis tipo Western. Este ensayo implica tres etapas sucesivas, a saber:

-Electrotransferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa: después de la electroforesis, tanto el gel de proteínas como la membrana de nitrocelulosa (Millipore), precortada al tamaño del gel, se equilibran en solución de transferencia (15 mM Tris Base pH 8.3, 120 mM glicina, 20% metanol) durante 15 min. La transferencia, *semi-seca*, se realiza en el sistema Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) durante 1 h a 12 volts constantes.

-Bloqueo de la membrana e incubación con anticuerpo primario: la membrana se bloquea con leche desgrasada (Carnation) al 5% en TBST (50 mM Tris Base pH 7.4, 145.3 mM NaCl, 0.05% Tween-20) durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente se lava la membrana con TBST 5 veces y se incuba ya sea con suero *anti-PvSymRK-CTER*, IgG's *anti-PvSymRK-CTER* o anticuerpo primario inmunopurificado *anti-CTER*, según corresponda (ver Anexo 1). Las diluciones del anticuerpo primario son según lo requiera el experimento.

-Incubación con anticuerpo secundario y detección de señal: posteriormente, la membrana se lava con TBST 5 veces y se incuba con IgG's *anti*-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (AP, por sus siglas en inglés; Sigma-Aldrich) en dilución 1:10,000, o conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés; Millipore) en dilución 1:5000 durante 2 h a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente se realizan 5 lavados más con TBST antes de revelar. La señal de AP se revela utilizando como sustrato NBT y BCIP (cloruro de tetrazolio nitro-azul y *p*-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato, respectivamente, Zymed). Se detiene la reacción al cabo de 2 min con 0.1 mM de EDTA. La señal de HRP se revela utilizando 1 ml del sustrato quimioluminiscente LuminataTM Forte Western HRP Substrate (Millipore), durante 1 min. Las imágenes se capturan con apoyo del equipo Molecular Imager ChemiDocTM XRS (Imaging System, BioRad) y del software ImageLab, BioRad.

5.8 Amplificación por PCR. La amplificación de secuencias de DNA por PCR, cuyo destino es su clonación en el vector intermediario (de entrada) pENTR-D TOPO (Invitrogen), se lleva a cabo utilizando la enzima de alta fidelidad DNA polimerasa *Pfu* (Fermentas) y su buffer correspondiente (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 0.1 % (v/v) Tritón X-100, 0.1 mg/ml BSA, 2 mM MgSO₄; Fermentas). La reacción incluye 0.2 mM dNTP's, 0.2 μM de cada oligonucleótido específico (Tabla 2), 2.5 ng de DNA como templado y 1 U de DNA polimerasa *Pfu* en un volumen final de 25 μl. Las reacciones de PCR se llevan a cabo en un termociclador Applied Biosystem y las condiciones de PCR son: un ciclo de 2 min a 94°C (desnaturalización), seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturalización), 30 s a la T_m de los oligonucleótidos específicos y 3 min a 72°C (extensión). El tamaño del producto amplificado se verifica por electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos de *PvSymRK* (1-10, 12), GFP (11) o GUS (13-16) utilizados en el presente trabajo.

#	Nombre	Secuencia 5'-3'
1	PvECICGFP3'	TCTCGGCTGTGGATGGGACAAGGC
2	PvRLK5'UTR	CACCCCTGCCGTTTCCAGGCTTG
3	pQECLW	AATGTCGACATCACACTCTATTCC
4	RL3.3	ATCAATTGCCTCACTGCC
5	RL7.3	ACCAAGAGCAATAGAGAGT
6	RL3.4	ACTCTCTATTGCTCTTGGT
7	RL3.1	GAAGATTTATGGTACTAGGT
8	RL7.1	TGTCAAGGCTACTCTGGA
9	cTERR	CGTCGACCTATCTCGGCTGTGGATG
10	cTERF	CAGATCTGAGGATGCTCTCATCATAGA
11	RS-GFP3	CAGCTTGCCGTAGGTGGC
12	RL3.2	CACCTCTACAAGTCCTAC
13	RSGUSCOOH	TTGTTTGCCTCCCTGCTGCGG
14	RSGUSATG	CACCATGGTCCGTCTGTAGAAACCC
15	RNAiGUSLW	TCTGCCAGTTCAGTTCGTTG
16	RNAiGUSUP	CACCGGCCAGCGTATCGTGCTGCG

5.9 Método de amplificación por PCR a partir de colonia bacteriana. Con ayuda de una asa, se pasa una colonia bacteriana a 50 µl de agua estéril, se resuspende (vórtex) y se congela a -80°C durante 10 min, para después desnaturalizar a 100°C durante 10 min. Este paso se repite 5 veces, después se centrifuga a 4000 rpm (Microcentrífuga Eppendorf 5418) durante 1 min y se toma 1 µl del sobrenadante como templado para una reacción de PCR en 25 µl. Esta reacción se realiza como se describe en inciso 5.8, pero utilizando una versión de DNA polimerasa Taq purificada en nuestro laboratorio. El buffer se compone de 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 8.8, 0.1 % (v/v) Tritón X100, 3 mM MgCl₂. Las reacciones de PCR se llevan a cabo en un termociclador Applied Biosystem y las condiciones de PCR son: un ciclo de 10 min a 94°C (desnaturalización), seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturalización), 30 s a 50°C para apareamiento

con oligonucleótidos específicos y 1 min a 72°C de síntesis, sin tiempo de extensión para la enzima.

5.10 Sistema Gateway de clonación por recombinación. La estrategia consiste en dos pasos, el primero es la clonación de la secuencia de DNA de interés en el vector de entrada pENTR-D TOPO (Invitrogen). La segunda es la recombinación del inserto (clonado en el vector pENTR-D) en el vector de expresión en plantas seleccionado, en nuestro caso pH7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002). En ambas etapas de clonación se procede según lo indicado por el proveedor. Las colonias positivas se seleccionan siguiendo el procedimiento descrito en el inciso 5.9.

5.11 Transformación de *Agrobacterium rhizogenes* y *A. tumefaciens*. La transformación de *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599 y *A. tumefaciens* cepa GB1301 con las construcciones hechas en pH7FWG2 se lleva a cabo por electroporación bajo condiciones estándar (1.6 volts durante dos segundos). Las células se recuperan en medio SOC (2 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 0.0025 M KCl, 0.01 M MgCl₂, 0.01 M NaCl, 0.02 M glucosa, pH 7) durante 2 h a 30°C. Se plaquea en medio LB (Luria-Bertani: 1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura y 1% NaCl, pH 7.5) en presencia de espectinomicina a 200 µg/ml y se incuban a 30 °C durante 48 h. Las colonias positivas se seleccionan siguiendo el procedimiento descrito en el inciso 5.9.

5.12 Agroinfiltración de hojas de tabaco. Un paso importante antes de la generación de raíces transgénicas en frijol, es confirmar que las construcciones generadas dirijan la correcta expresión de las proteínas quiméricas. Una opción es utilizar el sistema de agroinfiltración en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) con clonas de *A. tumefaciens* que portan el plásmido de expresión correspondiente ya que es un método de transformación y expresión transitoria, sencillo, rápido y de fácil análisis por microscopía de fluorescencia. Las semillas de tabaco se esterilizan (solución de 20% cloro - 2% Tritón X100) durante 5 min y se incuban en agar suave 0.1 % durante 16 h a 4°C previo a su germinación, que

se realiza en cajas con medio sólido MS 0.5 % (NH_4NO_3 16,5 mg/ml; KNO_3 19 mg/ml; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,4 mg/ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,7 mg/ml; KH_2PO_4 1,7 mg/ml; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,69 mg/ml; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,86 mg/ml; H_3BO_3 0,62 mg/ml; KI 0.083 mg/ml; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/ml; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/ml; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/ml; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00556 mg/ml; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.00746 mg/ml), suplementado con 1 % sacarosa, 10 mM buffer MES, pH 5.6; incubadas en posición vertical a 28°C durante 7 días. Posteriormente, las plántulas se transplantan a macetas con Metromix como sustrato y se continúa el crecimiento de la plántula a 28°C en cuarto de crecimiento (Luz/Oscuridad= 16h/8h) durante 6 semanas, con riego cada 3 días con solución B&D (Broughton y Dilworth, 1971). Después de este tiempo, las hojas de tabaco son susceptibles de ser agroinfiltradas con *A. tumefaciens* cepa GB1301 (que porta las construcciones de interés). Las bacterias se crecen previamente en 3 ml de medio LB líquido en presencia de los antibióticos apropiados (espectinomicina 200 µg/ml, rifampicina 100 µg/ml y gentamicina 50 µg/ml), durante 48 h a 28°C en agitación constante. Se toman 100 µl de este cultivo y se transfieren a 6 ml de medio LB líquido sin antibiótico, suplementado con 10 mM buffer MES, pH 5.6 y 5 µl de acetosiringona 100 mM, el cultivo se crece durante 16 h a 28°C. Una vez que el cultivo ha alcanzado una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1.0, se centrifuga a 4000 rpm (Microcentrífuga Eppendorf 5418) durante 10 min y la pastilla se resuspende en 5 ml de 10 mM MgCl_2 . Se agregan 5 µl de acetosiringona 100 mM y se deja incubando a temperatura ambiente durante 3 h. Previo a la agroinfiltración, las plantas de tabaco se dejan en total oscuridad durante 24 h, esto para favorecer la infiltración de la bacteria. El volumen total de la suspensión de bacterias se toma en una jeringa (sin aguja) de 5 ml y mediante presión mecánica se inyectan en el envés de la hoja, procurando infiltrar en la mayor área posible. Se agroinfiltran 3 hojas por planta, de un total de 3 plantas por construcción. Las plántulas se incuban a 28°C durante 2 días para después observar las hojas al microscopio de fluorescencia.

5.13 Observación de hojas de tabaco agroinfiltradas. La observación de las hojas de tabaco agroinfiltradas, se realiza dos o tres días después de la agroinfiltración. Con ayuda de un sacabocado de 4 mm de diámetro, se corta el fragmento de hoja que fue agroinfiltrado y se deja en agua durante 15 min para después observarse directamente al microscopio de epifluorescencia.

5.14 Generación de raíces transgénicas de frijol que expresen las proteínas quiméricas PvSymRK-GFP y GUS-GFP. Las construcciones tienen como base el vector pH7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) el cual está diseñado para la expresión de proteínas quiméricas fusionadas a la proteína fluorescente GFP (ver sección Resultados, Fig 16 a), siendo ésta a la vez el marcador de selección de raíces transgénicas e indicador de la citolocalización de la proteína quimérica. Las construcciones se generaron aplicando la metodología recombinante Gateway (Invitrogen). La generación de raíces transgénicas se basa en el protocolo descrito por el grupo del Dr. Federico Sánchez (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007), con algunas modificaciones. En breve, las plantas de frijol, germinadas bajo condiciones de esterilidad durante 2 días a 28°C, se inoculan con una suspensión de *Agrobacterium rhizogenes* K599 previamente transformado con la construcción correspondiente. La inoculación se realiza alrededor del nodo del cotiledón, hiriendo levemente con la aguja de una jeringa para inmediatamente inyectar 5-10 µl de la suspensión de bacterias. Posteriormente, las plantas se transfieren a tubos de boca ancha que contienen un tubo falcon de 15 ml con medio Fåhraeus líquido. Las plantas se colocan en el cuarto de crecimiento (Luz/Oscuridad= 16h/8h, T= 28°C) durante 7-10 días hasta observar el desarrollo de pequeños tumores en el sitio de inoculación y la formación de primordios de raíces. Se determina cuales de los primordios de raíz son tipo transgénicos mediante observación directa de la planta bajo un estereomicroscopio con iluminación epifluorescente y utilizando como criterio de selección la fluorescencia de GFP, parte de la proteína quimérica que se desea expresar. Se eliminan los primordios de raíz no fluorescentes para favorecer el desarrollo de las raíces transgénicas que expresen la proteína quimérica. Previo a la observación al microscopio, se

permite que las raíces fluorescentes se recuperen por dos días. Las raíces transgénicas se colocan en una caja Petri que contiene un orificio en el centro, cubierto con un portaobjetos pegado a la caja. Se adiciona medio Fåhreaus líquido a la raíz, se cubre con una película de papel de celulosa (celofán dulce) y se realiza la observación directa al microscopio.

5.15 Incubación con factores Nod. Las plantas compuestas con raíces transgénicas se colocan en las cajas Petri como se describe en el inciso 5.14. Se seleccionan pelos radicales vivos, en crecimiento y que presenten fluorescencia asociada a GFP, en seguida se agregan 50 µl de factores Nod 10^{-8} M de *R. etli* cepa CE3 directamente. Se capturan imágenes antes y después de la aplicación con factores Nod.

5.16 Captura y procesamiento de imágenes. Las imágenes tanto de fluorescencia como de luz transmitida se capturan utilizando una cámara de CCD (Cool SNAP HQ2 Photometrics, Roper Scientific) acoplada a un microscopio invertido marca Nikon (Eclipse TE 300) que cuenta con óptica Nomarski, un obturador (Shutter Uniblitz) que permite el paso de la luz de manera automatizada y un sistema de filtros giratorio (Lambda, Shutter Instruments) que controla el uso de los filtros de emisión adecuados y de luz polarizada. Para la detección de la fluorescencia de GFP se utiliza el juego de filtros de excitación 495nm y de emisión HQ513/30 y con el dicroico 515 CDXR. La captura y edición de imágenes se realizan a través de los paquetes computacionales Metafluor y Metamorph (Universal Imaging), respectivamente.

6.- RESULTADOS.

6.1 Análisis de la expresión del receptor *PvSymRK* en pelos radicales de plántulas de frijol de diferentes edades (2, 3, y 4 días *post-germinación*).

-Expresión del transcrito de *PvSymRK* en pelos radicales de frijol.

Para tener una perspectiva sobre la expresión de *PvSymRK* en pelos radicales de frijol tipo silvestre variedad Negro Jamapa, se realizó un análisis comparativo por RT-qPCR de la acumulación del mensajero de *PvSymRK* en diferentes partes de la raíz colectadas a 2 dpv. Las muestras analizadas corresponden a pelos radicales, ápice de la raíz y el remanente de la raíz rasurada (es decir, zonas de elongación y de maduración de la raíz sin pelos radicales). Como control, se incluyó una muestra de raíz completa. La muestra de pelos radicales presentó una mayor acumulación relativa del transcrito de *PvSymRK* que en las muestras de RNA de raíz completa y de raíz rasurada. Es de hacer notar que la acumulación relativa del transcrito en raíz rasurada es comparable a lo encontrado en la muestra de raíz completa, mientras que el mensajero es poco abundante en el ápice de raíz (Fig. 8, resultados no publicados en colaboración con Jesús Montiel y Noreide Nava). Si bien este análisis sólo se realizó con muestras de raíz de plántula de 2 dpv y debería extenderse a muestras de plántulas de otras edades o tiempos *post-germinación*, es importante resaltar que la mayor acumulación en pelos radicales refuerza la noción de que, al igual que en otras leguminosas, *SymRK* juega un papel relevante en las etapas iniciales de la simbiosis frijol-rhizobia (Schneider *et al.*, 1999; Catoira *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Capoen *et al.*, 2005; Limpens *et al.*, 2005; Sánchez-López *et al.*, 2011).

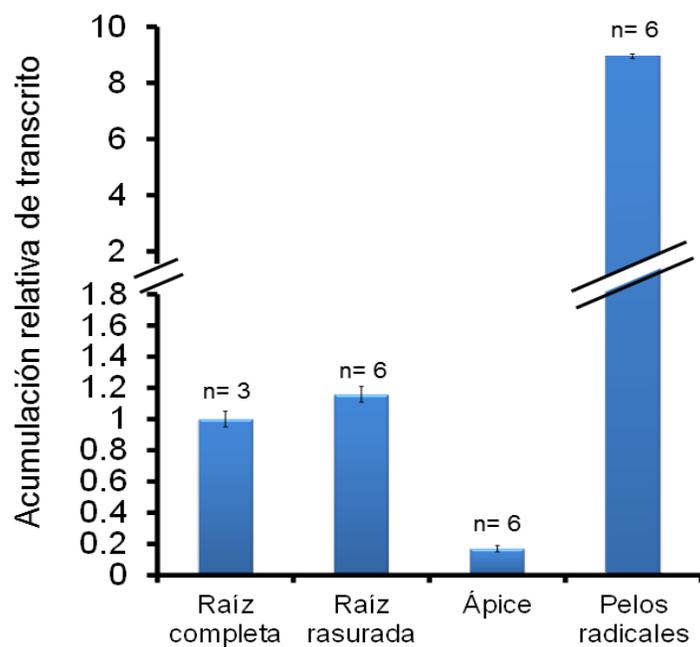


Fig. 8 Análisis de la acumulación del transcrito de *PvSymRK* en pelos radicales de frijol de 2 dpq. La determinación de la acumulación del transcrito se llevó a cabo por RT-qPCR usando oligonucleótidos específicos. Los valores de acumulación relativa del transcrito se obtuvieron por normalización respecto a la acumulación del mensajero de EF1 α (control de referencia) y se consideró como unidad el valor de la acumulación de transcrito en la raíz completa. La barra representa el error estándar de muestras de dos replicas biológicas, cada una por triplicado (a excepción de raíz completa que corresponde a una muestra biológica).

-Detección de *PvSymRK* en extracto total de proteínas de pelos radicales de frijol.

Con el fin de establecer las condiciones experimentales para el análisis de la expresión de la proteína *PvSymRK*, se aislaron los pelos radicales de aproximadamente 70 raíces de plántulas de frijol variedad Negro Jamapa de 2 dpq. El extracto total de proteínas de los pelos radicales se resuspendió en 50 μ l de buffer de carga y fue analizado por electroforesis (SDS-PAGE), bajo condiciones reductoras. Con el propósito de determinar la integridad de las proteínas en los extractos y cuál es la cantidad mínima de extracto visible al teñir el gel con azul de Coomassie, se procedió a cargar, por pozo, volúmenes crecientes de extracto de proteínas. En la Fig. 9 se observa un patrón de bandas

bien definidas, lo que indica que aparentemente no hay degradación masiva de proteínas. De acuerdo a este resultado, los volúmenes adecuados para trabajar son de 6.5 μ l y 12.5 μ l de extracto total de proteínas.

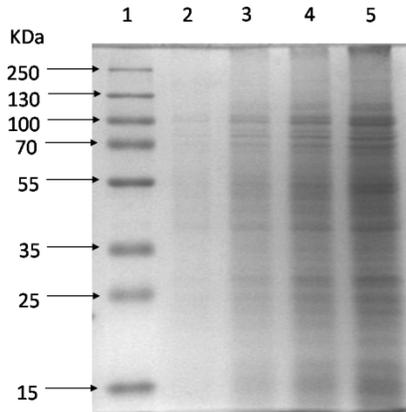


Fig. 9 Análisis electroforético de extracto total de proteínas de pelos radicales de frijol de 2 dpq. (1) Marcador de peso molecular de proteínas (KDa), (2) 1 μ l, (3) 3.5 μ l, (4) 6.5 μ l y (5) 12.5 μ l de extracto total de proteínas. SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie.

La presencia del receptor *PvSymRK* en el extracto total de proteínas de pelos radicales se determinó por ensayos tipo Western blot. Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó la detección de *PvSymRK* en muestras de nódulos y raíz, utilizando anticuerpos policlonales (*anti-PvSymRK*) que se generaron utilizando la región extracelular de *PvSymRK* como inmunógeno (Sánchez-López *et al.*, 2011). Desafortunadamente, al inicio del presente trabajo la cantidad de estos anticuerpos disponible en el laboratorio era muy limitada, por lo que se optó por caracterizar un segundo suero de conejo (suero *anti-PvSymRK*-CTER; resultados no publicados del Dr. David Jáuregui) inmunizado con la proteína tiorredoxina en fusión traduccional a una región no conservada del extremo carboxilo terminal de *PvSymRK* (Thio-CTER). Con el propósito de determinar la especificidad del suero *anti-PvSymRK*-CTER, muestras equivalentes a los extractos de proteínas totales de pelos radicales analizados en la Fig. 9 fueron analizados por Western blot utilizando una dilución 1:500 de este suero. Los resultados obtenidos se ilustran en la Fig. 10. En los carriles con proteínas de pelos radicales, el suero *anti-*

PvSymRK-CTER detectó una banda de aproximadamente 100 KDa (marcada con asterisco), que corresponde al tamaño esperado para la proteína *PvSymRK* sin péptido señal (Sánchez-López *et al.*, 2011). Hay una segunda banda, mayoritaria, de aproximadamente 65 KDa, presente en las dos muestras analizadas en este ensayo, pero no detectada en estudios previos (Sánchez-López *et al.*, 2011), por lo que pudiera ser una contaminación asociada al manejo de la muestra (por ejemplo, queratina cuya masa molecular oscila entre 40-65 KDa) y/o una reacción cruzada del suero, es decir inespecífica, que detecta algún otro antígeno presente en el extracto de proteínas de pelo radical. Adicionalmente, se detectaron una serie de bandas de menor tamaño (>55 KDa), poco abundantes. Por el momento no contamos con evidencia suficiente que nos permita discernir si las bandas >55 KDa corresponden a productos de degradación de la proteína de 100 KDa o a una inespecificidad del suero.

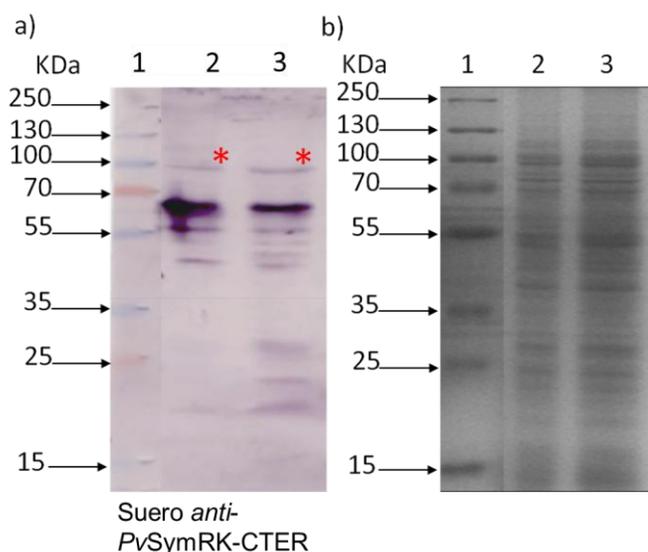


Fig. 10 Análisis por Western blot de la expresión de *PvSymRK* en pelos radicales de frijol de 2 dpv. (a) Western blot de pelos radicales de 2 dpv incubados con suero *anti-PvSymRK-CTER* (dilución 1:500) revelado por fosfatasa alcalina. (b) réplica de gel, teñido con azul de Coomassie. (1) Marcador de peso molecular de proteínas, (2) 6.5 µl, y (3) 12.5 µl del extracto total de proteínas de pelos radicales utilizado en el experimento ilustrado en Fig. 9. En ambos casos, SDS-PAGE al 12%.

6.2 Detección de PvSymRK por ensayos de Western blot en extracto total de proteínas de pelos radicales con anticuerpos inmunopurificados.

Con el propósito de determinar la especificidad de la señal detectada por ensayos de Western blot, se consideró necesario inmunopurificar los anticuerpos *anti-PvSymRK* presentes en el suero *anti-PvSymRK-CTER*. El Anexo 1 describe la estrategia que se siguió para precipitar las inmunoglobulinas totales del suero (IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*) e inmunopurificar la fracción de anticuerpos *anti-PvSymRK* presentes en este suero. A partir de este punto del texto serán referidos como anticuerpos *anti-CTER*. Brevemente, los anticuerpos *anti-CTER* se obtuvieron por cromatografía de inmunoafinidad, utilizando como antígeno de captura la proteína recombinante Thio-CTER de 25 KDa, utilizada como inmunógeno para generar el suero *anti-PvSymRK-CTER*. Las propiedades de las fracciones de la cromatografía se analizaron por ensayos tipo Western blot y se seleccionaron las fracciones que contenían anticuerpos *anti-CTER*.

Muestras de extracto total de proteínas de pelos radicales equivalentes a los de las muestras en la Fig. 9 se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos *anti-CTER* inmunopurificados. El resultado mostró que los anticuerpos *anti-CTER* no detectaron banda alguna aún después de 10 min de revelado por fosfatasa alcalina. Durante este ensayo se incluyeron muestras de proteínas totales de pelos radicales incubadas con suero e IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*, donde en ambos casos se detectó la banda de aproximadamente 100 KDa (dato no mostrado), similar a lo observado en la figura 10. Una posible explicación a este resultado se refiere a una limitada sensibilidad del ensayo utilizado para caracterizar los anticuerpos, insuficiente para detectar bajas concentraciones de PvSymRK.

Con el propósito de aumentar la sensibilidad en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo por Western blot, se optó por el método de revelado por quimioluminiscencia. Este método combina el uso de anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) y un sustrato comercial que se torna quimioluminiscente (Luminata ForteTM, Millipore). La figura 11 muestra la

sensibilidad del método, utilizando la proteína recombinante Thio-CTER (25 KDa) en diferentes cantidades (1, 10 y 100 ng), e incubando tanto con IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER* (1:500) como con los anticuerpos *anti-CTER* (dilución 1:250) como primer anticuerpo. En este ensayo, tanto las IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER* como los anticuerpos *anti-CTER* detectaron la proteína recombinante Thio-CTER a partir de cantidades tan bajas como 1 ng, empleando un tiempo de revelado y exposición tan breve como 1 min.

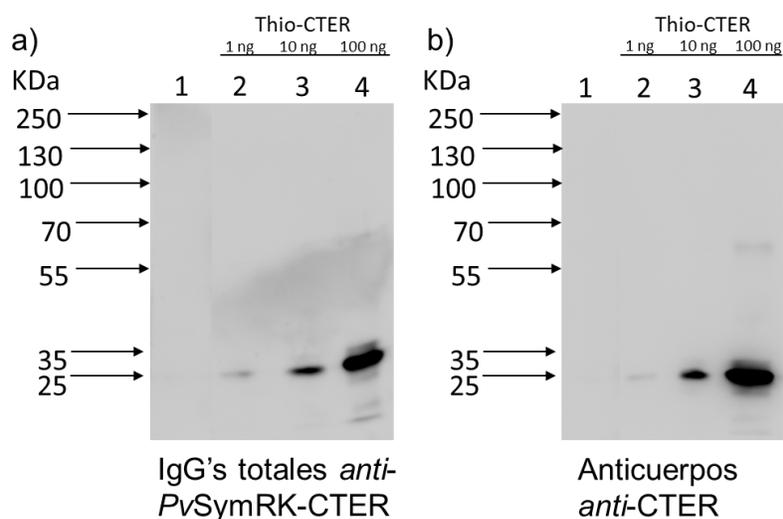


Fig. 11 Sensibilidad de la inmunodetección de Thio-CTER con anticuerpos *anti-CTER* utilizando el método de quimioluminiscencia. (a) Membrana incubada con IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*; (b) membrana incubada con anticuerpos *anti-CTER* inmunopurificados, (dilución 1:250, ver Anexo 1). Muestras en carriles: (1) Marcador de peso molecular de proteínas (KDa); (2) 1 ng, (3) 10 ng, (4) 100 ng de proteína recombinante Thio-CTER, respectivamente. Tiempo de revelado y exposición: 1 min.

Una vez confirmada la sensibilidad del método, se procedió a analizar extractos totales de proteínas de pelos de 2, 3 y de 4 dpv utilizando los anticuerpos *anti-CTER*. El resultado mostró que los anticuerpos *anti-CTER* detectaron un doblete de ~100 y 110 KDa similar a lo reportado previamente en Sánchez-López *et al.*, 2011 (Fig. 12 a). Adicionalmente los anticuerpos *anti-CTER* detectaron dos bandas de menor peso molecular, una de ~60 KDa y otra de ~40 KDa (Fig. 12 a);

una explicación pudiera ser que estas bandas corresponden a productos de degradación de *PvSymRK*. Como control positivo se usó la proteína recombinante Thio-CTER (Fig. 12 a). Por otro lado, y con el propósito de tener un control de referencia, se realizó Western blot incubado con anticuerpos *anti-PvSymRK* (Sánchez-López *et al.*, 2011). Estos anticuerpos detectaron solo una banda de ~100 KDa en proteínas de pelos radicales y no el doblete de ~100-110 KDa, observación que ya había sido reportada (Sánchez-López *et al.*, 2011). Adicionalmente, en este ensayo se detectaron algunas proteínas de menor peso molecular, probablemente asociado a la mayor sensibilidad del método de quimioluminiscencia (Fig. 12 b).

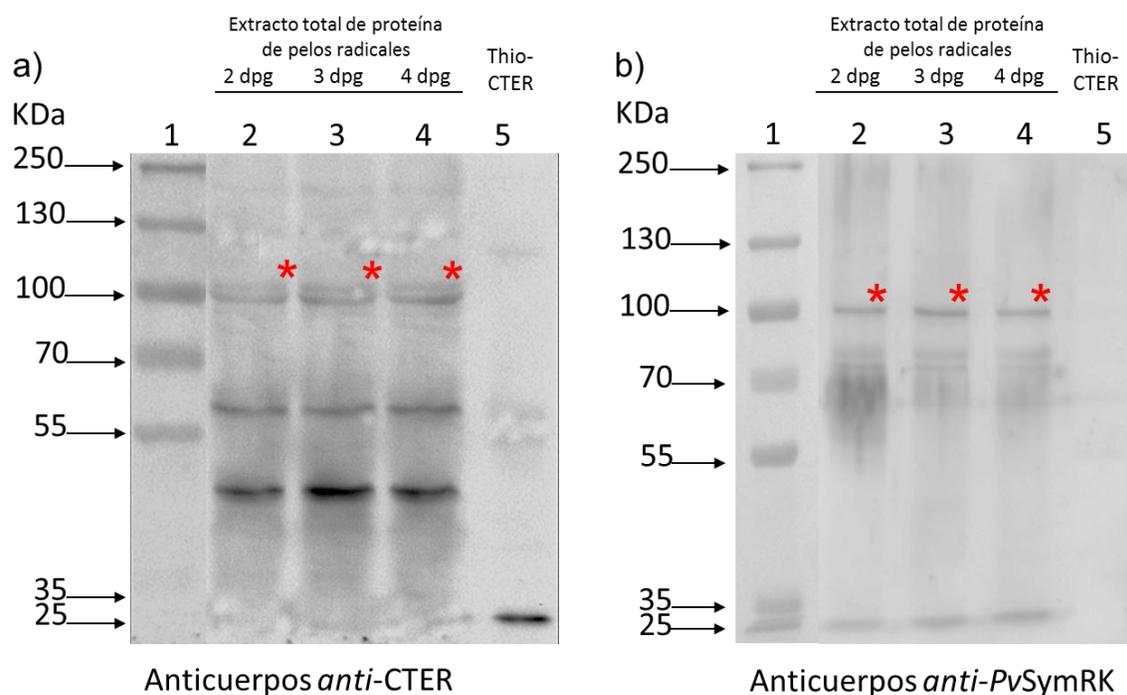


Fig. 12 Reconocimiento de *PvSymRK* por los anticuerpos *anti-CTER*. (a) Membrana incubada con anticuerpos *anti-CTER* (1:250); (b) membrana incubada con anticuerpos *anti-PvSymRK* (1:500). Muestras en carriles: (1) Marcador de peso molecular de proteínas (KDa); extracto total de proteínas de pelos radicales de plántulas de: (2) 2 dpg, (3) 3 dpg y (4) 4 dpg y (5) 5 ng de proteína recombinante Thio-CTER, respectivamente. Los asteriscos indican la detección de *PvSymRK*. Quimioluminiscencia detectada a 1 min de exposición.

Los resultados muestran que ambos anticuerpos *anti-CTER* y *anti-PvSymRK* reconocen una banda de ~100 KDa, correspondiente a *PvSymRK*, similar a lo reportado por Sánchez-López *et al.*, 2011. Estos resultados demuestran la presencia de *PvSymRK* en los pelos radicales de frijol de 2, 3 y 4 dpj.

6.3 Generación de raíces transgénicas de frijol que expresen el receptor quimérico fluorescente *PvSymRK-GFP*.

Con el objetivo de aplicar una herramienta molecular que nos permita determinar la localización y distribución subcelular de *PvSymRK* en raíces transgénicas de frijol por microscopía de fluorescencia en células vivas, se generó una construcción que dirige la expresión de una proteína quimérica fluorescente en la cual *PvSymRK* está fusionado a GFP.

-Construcción y clonación del cassette de expresión p35S::*PvSymRK-GFP* en un vector de expresión en plantas.

La estrategia de construcción y clonación empleada se basó en una amplificación por PCR (con oligonucleótidos específicos 1 y 2; ver Tabla 2 y Fig. 13) a partir de un plásmido que porta las secuencias 5'UTR y codificante del cDNA de *PvSymRK* (clona 4.12). El fragmento amplificado de ~3.0 Kb (Fig. 13 b) se clonó en el vector de entrada pENTR-D TOPO (sistema Gateway, Invitrogen). La identificación y confirmación de clonas positivas se realizó mediante análisis por PCR utilizando juegos de oligonucleótidos específicos (combinación de oligonucleótidos 2 y 3, y de 7 y 8 ver Tabla 2 y Fig. 13). La figura 14 ilustra los resultados representativos del análisis de las clonas: pENTR-5'*PvSymRK*4 y pENTR-5'*PvSymRK*10.

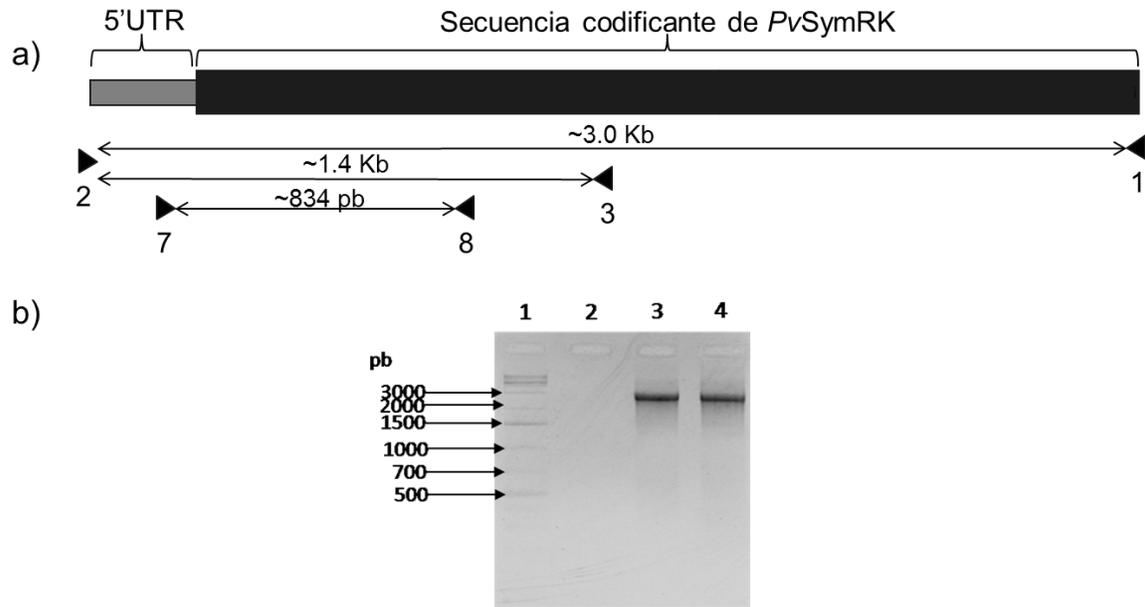


Fig. 13 Amplificación por PCR de *PvSymRK*. (a) Representación esquemática del cDNA de *PvSymRK* en la que se indica la posición de los oligonucleótidos (1, 2, 3, 7 y 8; ver Tabla 2) utilizados en las reacciones de amplificación por PCR. (b) Resultado de la amplificación del cDNA de *PvSymRK* por PCR. La amplificación por PCR (oligonucleótidos 1 y 2) incluyó la región 5'UTR y la región codificante de *PvSymRK*. (1) Marcador de peso molecular de DNA (pb), (2) control negativo, (3 y 4) producto de PCR de *PvSymRK* (~3.0 Kb), reacciones por duplicado.

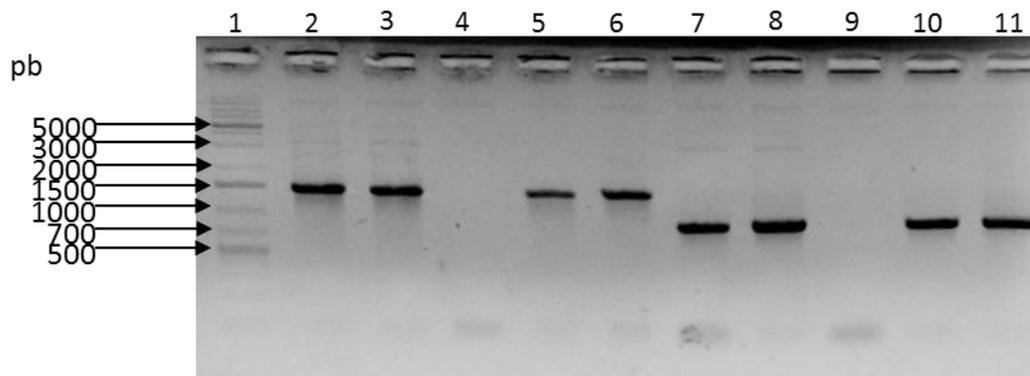


Fig. 14 Análisis por PCR de las clonas pENTR-5'*PvSymRK*4 y pENTR-5'*PvSymRK*10. Muestras en carriles: (1) Marcador de peso molecular de DNA (pb), (2 y 7) pENTR-5'*PvSymRK*4, (3 y 8) pENTR-5'*PvSymRK*10, (4 y 9) control negativo, (5-6 y 10-11) control positivo (clona 4.12). Carriles 2-6, juego de

oligonucleótidos 2 y 3 (tamaño ~1.4 Kb). Carriles 7-11, juego de oligonucleótidos 7 y 8 (tamaño ~834 pb), ver figura 13.

La segunda etapa en la construcción implicó un evento de recombinación *in vitro* (sistema Gateway, Invitrogen) entre pENTR-5'PvSymRK4 y el vector de expresión en plantas pH7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002). La recombinación favorece que el cDNA de PvSymRK quede en fusión traduccional (en fase) con la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente GFP, presente en el plásmido pH7FWG2. La expresión del cDNA quimérico PvSymRK-GFP está bajo el control del promotor constitutivo 35S. Se seleccionaron dos colonias recombinantes positivas, pH7FWG2-5'PvSymRK9 y pH7FWG2-5'PvSymRK12, cuya identidad se confirmó por PCR (Fig. 15) y secuenciación (usando oligonucleótidos 2, 12 y 11, ver Tabla 2). El análisis de secuencia mostró que ambos plásmidos portan la secuencia 5'UTR seguida de la secuencia codificante de PvSymRK en fase con la secuencia codificante de GFP. Dado que la experiencia en el laboratorio muestra que algunas construcciones en vectores de plantas pueden ser inestables una vez transformadas en *Agrobacterium rhizogenes* K599, se decidió trabajar con ambas clonas.

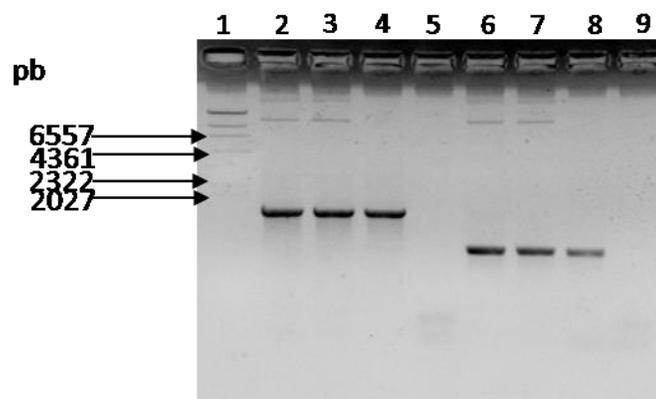


Fig. 15 Análisis por PCR de las clonas pH7FWG2-5'PvSymRK utilizando oligonucleótidos específicos. (1) Marcador de peso molecular de DNA (pb), (2 y 6) pH7FWG2-5'PvSymRK9, (3 y 7) pH7FWG2-5'PvSymRK12, (4 y 8) control positivo clona 4.12, (5 y 9) control negativo. Carriles 2 a 5: reacción de PCR con juego de

oligonucleótidos 2 y 3 (tamaño ~1.4 Kb), y carriles 6 a 9 con juego de oligonucleótidos 7 y 8 (tamaño ~834 pb), ver Fig. 13 a.

-Estructura primaria de la quimera fluorescente *PvSymRK-GFP*.

La construcción generada se ilustra en la figura 16 a. La proteína quimérica fluorescente *PvSymRK-GFP* diseñada en este trabajo está constituida por 1,174 aminoácidos (919 residuos corresponden a *PvSymRK* y 255 a GFP) y tiene un peso molecular teórico de 131.84 KDa. La estructura primaria de esta quimera se esquematiza en la figura 16 b. De acuerdo al análisis con el programa TargetP1.1 se predice una localización membranaral.

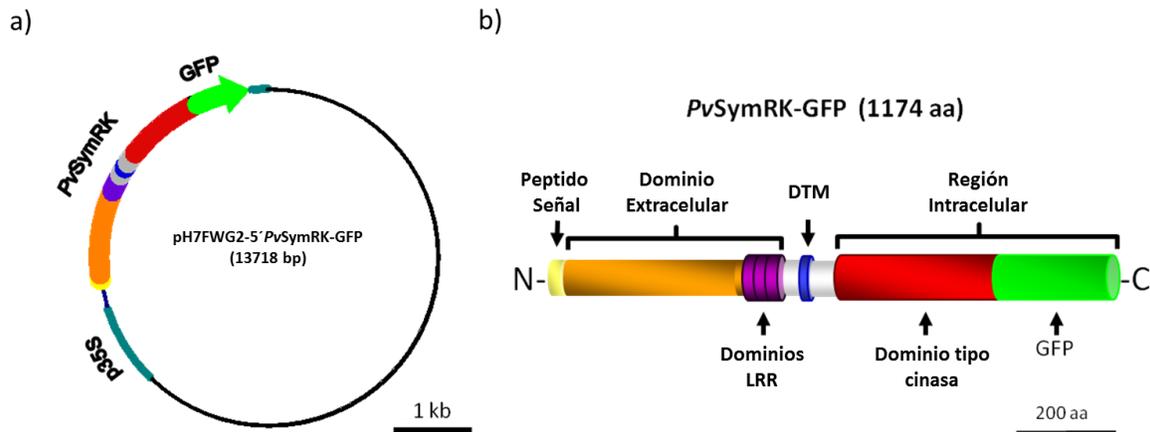


Fig. 16 Proteína quimérica *PvSymRK-GFP*. (a) Representación esquemática del plásmido pH7FWG2-5' *PvSymRK-GFP*. (b) Esquema de la estructura primaria de la proteína quimérica fluorescente *PvSymRK-GFP*. DTM: Dominio Transmembranaral.

-Construcción y clonación del cassette de expresión p35S::GUS-GFP en un vector de expresión en plantas.

Con el propósito de tener como referencia la expresión de una proteína quimérica fluorescente, citosoluble, y con tamaño similar al de *PvSymRK-GFP*, se diseñó la construcción del cassette de expresión p35S::GUS-GFP para expresar la proteína

GUS fusionada a GFP (GUS-GFP). Para obtener el cDNA quimérico correspondiente se clonó la secuencia codificante de la enzima β -glucuronidasa, conocida como GUS, en el mismo vector de expresión en plantas que el utilizado para la expresión de la quimera fluorescente *PvSymRK-GFP*, es decir pH7FWG2. Para tal efecto, la secuencia codificante de GUS (~1.7 Kb) se amplificó por PCR (oligonucleótidos 13 y 14; ver Tabla 2 y Fig. 17 a) usando como templado el plásmido pENTR-GUS (Invitrogen). El fragmento amplificado (Fig. 17 b) se clonó en el vector de entrada pENTR-D TOPO. Dos clonas se seleccionaron (pENTR-GUS7 y pENTR-GUS8; Fig. 17 c), siendo la clona pENTR-GUS7 la utilizada para el paso de clonación por recombinación en el vector pH7FWG2. En esta etapa se seleccionaron dos colonias positivas (pH7FWG2-GUS7 y pH7FWG2-GUS8), cuya identidad se confirmó por PCR (Fig. 17 d) (oligonucleótidos 13 y 16) y secuenciación utilizando los oligonucleótidos 11 y 15.

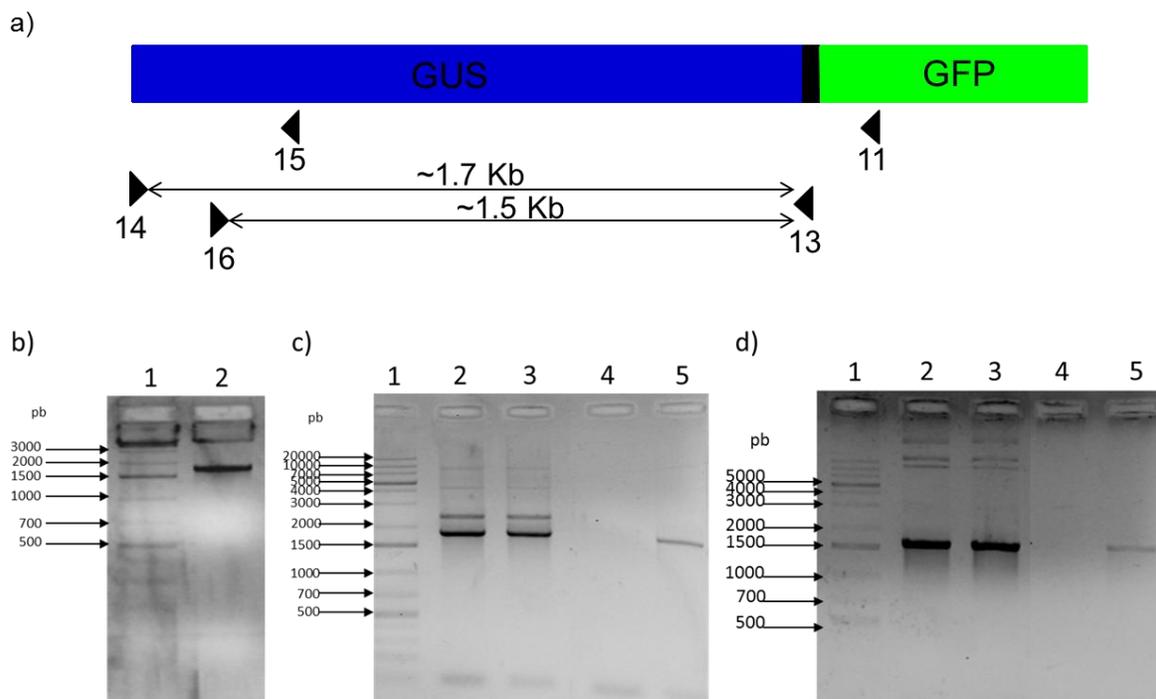


Fig. 17 Etapas de construcción y clonación del cassette de expresión p35S::GUS-GFP. (a) Representación esquemática del cDNA quimérico GUS-GFP en la que se indica la posición de los oligonucleótidos (11, 13, 14, 15 y 16; ver Tabla 2) utilizados en las reacciones de amplificación por PCR. (b, c y d) Análisis por PCR

de las etapas de clonación requeridas para generar la construcción pH7FWG2-GUS. (b) Amplificación por PCR del fragmento que codifica para GUS, carril 2. Análisis por PCR de las clonas: (c) pENTR-GUS7 (carril 2) y pENTR-GUS8 (carril 3); y (d) pH7FWG2-GUS7 (carril 2) y pH7FWG2-GUS8 (carril 3). Las reacciones de PCR en b y c, se realizaron con los oligonucleótidos 13 y 14 (tamaño ~1.7 Kb); en d, con los oligonucleótidos 13 y 16 (tamaño ~1.5 Kb). Carriles 1, marcador de peso molecular de DNA (pb); carriles 4, control negativo de PCR; carriles 5, control positivo de amplificación por PCR usando como templado pENTR-GUS.

-Estructura primaria de GUS-GFP.

La construcción generada, pH7FWG2_GUS-GFP, se ilustra en la figura 18 a. La proteína quimérica resultante es de 858 aminoácidos (603 y 255 residuos correspondientes a GUS y GFP, respectivamente; ver Fig. 18 b) y tiene un peso molecular teórico de 97.05 KDa. En su estructura primaria no hay secuencia de entrada a la vía secretoria, ni regiones transmembranales; de acuerdo al análisis con el programa TargetP1.1 se predice una localización citoplasmática.

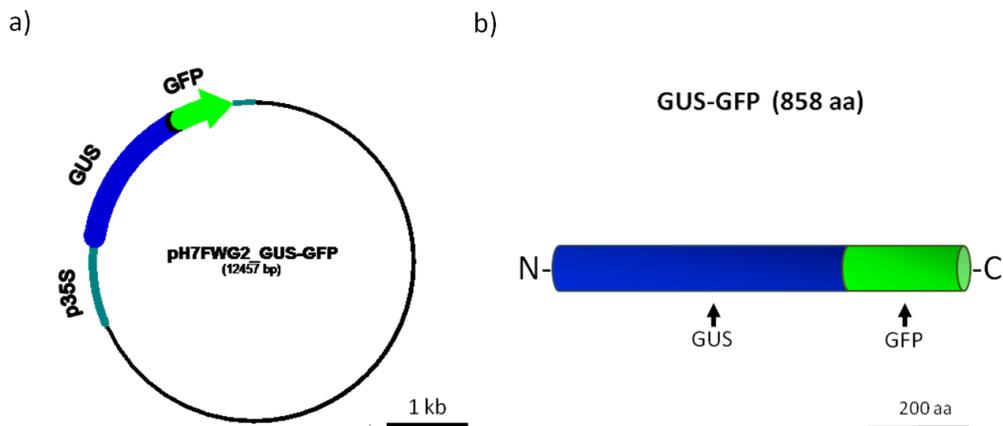


Fig. 18 Proteína quimérica GUS-GFP. (a) Representación esquemática del plásmido pH7FWG2_GUS-GFP. (b) Esquema de la estructura primaria de la proteína quimérica fluorescente GUS-GFP.

6.4 Análisis de la expresión de la proteína quimérica fluorescente *PvSymRK-GFP* en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con *Agrobacterium tumefaciens*.

Previo a la generación de raíces transgénicas en frijol, un paso importante es confirmar que las construcciones generadas dirijan la correcta expresión de las proteínas heterólogas de interés. Una de las opciones es utilizar el sistema de agroinfiltración en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) con clonas de *Agrobacterium tumefaciens* que portan el plásmido de expresión correspondiente. Este es un método de transformación y expresión transitoria, ampliamente utilizado debido a su sencillez, rapidez y fácil análisis por microscopía de fluorescencia cuando el marcador reportero es GFP u otra proteína fluorescente (D'Aoust *et al.*, 2008).

Para los ensayos de agroinfiltración y expresión transitoria en hojas de tabaco, se seleccionaron varias clonas de *A. tumefaciens* transformadas con los plásmidos pH7FWG2-5´*PvSymRK12* y pH7FWG2-GUS7, respectivamente. La observación de las células del pavimento de segmentos de hojas transformadas (48 h después de la agroinfiltración) se realizó por microscopía de epifluorescencia y de luz transmitida. El flujo citoplasmático observado por microscopía de luz transmitida (campo claro) permitió confirmar que las células agroinfiltradas estaban vivas. El análisis por microscopía de epifluorescencia de segmentos de hojas independientes agroinfiltrados con pH7FWG2-5´*PvSymRK12* mostró pequeñas zonas de fluorescencia (Fig. 19 a y b), lo que indica que la proteína quimérica fluorescente *PvSymRK-GFP* se expresa. La señal fluorescente detectada está, aparentemente, asociada a la membrana plasmática de las células del pavimento (comunicación personal del Dr. Luis Cárdenas, especialista en microscopía de epifluorescencia de tejidos vegetales). Este resultado es muy acorde a lo esperado pues la estructura primaria de la proteína quimérica fluorescente contiene las secuencias péptido señal y dominio transmembranal de *PvSymRK* (Fig. 16 b). Por otro lado, se observó que la fluorescencia en estas células no se veía afectada por el flujo citoplasmático, es decir, no presentaba movimiento, tal como se espera de

una proteína asociada a la membrana plasmática. Tampoco fue posible distinguir organelos como núcleo o vacuola, cuyos perfiles son fácilmente reconocidos cuando la proteína fluorescente expresada es soluble en citoplasma.

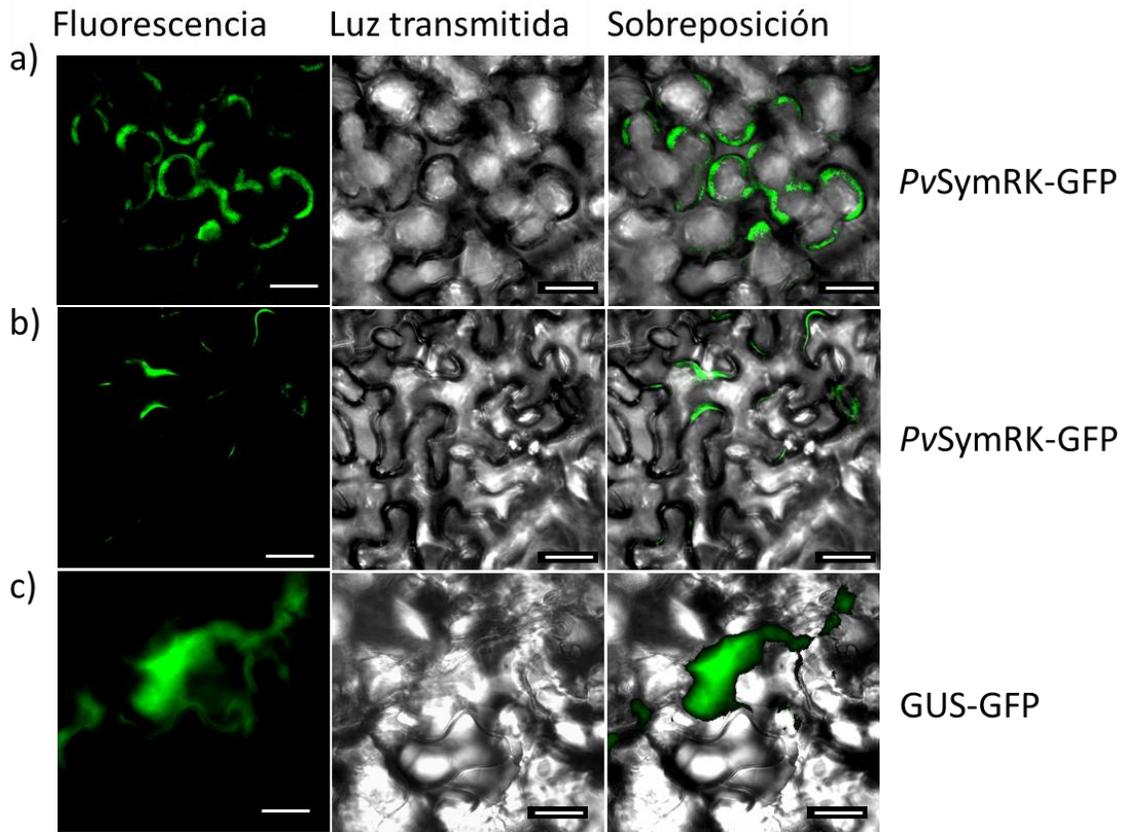


Fig. 19 Análisis por microscopía de epifluorescencia de células de pavimento de hojas de tabaco agroinfiltradas con *A. tumefaciens* transformada con: (a y b) pH7FWG2-5'PvSymRK12 y (c) pH7FWG2-GUS7. Las imágenes muestran células del pavimento de diferentes hojas agroinfiltradas. La escala representa 20 μ m. $n=3$.

Las hojas agroinfiltradas con pH7FWG2-GUS7 presentaron un patrón de fluorescencia distinto. Los resultados ilustrados en la figura 19 c, muestran que, en estas hojas, la fluorescencia es intracelular, difusa y con una distribución típica de proteínas solubles en citoplasma. En este caso fue posible distinguir el perfil de organelos como núcleo y vacuola (Fig. 19 c, columna fluorescencia). Además, durante la captura de imágenes en serie se apreció flujo citoplasmático indicativo

de movimiento de vesículas (resultados no mostrados). En su conjunto estos resultados confirmaron que tanto la construcción pH7FWG2-5'PvSymRK12 como pH7FWG2-GUS7 dirigen la expresión de las proteínas quiméricas fluorescentes PvSymRK-GFP y GUS-GFP, respectivamente; también muestran que cada una de estas proteínas presentan una aparente distribución subcelular distinta: PvSymRK-GFP se localiza en la membrana plasmática, mientras que GUS-GFP presenta una distribución tipo citoplasmática.

6.5 Análisis de la expresión de la proteína quimérica fluorescente PvSymRK-GFP en raíces transgénicas de frijol.

Con el propósito de generar raíces transgénicas de frijol que expresen las proteínas quiméricas fluorescentes PvSymRK-GFP y GUS-GFP, se transformó *A. rhizogenes* K599 con los plásmidos pH7FWG2-5'PvSymRK12 y pH7FWG2-GUS7, respectivamente. Las clonas resultantes fueron utilizadas para la generación de plantas compuestas con raíces transgénicas, de acuerdo a la estrategia reportada por Estrada-Navarrete y colaboradores (2007).

El análisis minucioso por microscopía de epifluorescencia y de luz transmitida de raíces transgénicas vivas de 3 lotes de raíces independientes mostró que la fluorescencia asociada a las proteínas quiméricas no presentaba una distribución tisular homogénea, sino que se encontró en secciones de raíces transgénicas, es decir sólo se encontraron sectores discontinuos de fluorescencia (resultados no mostrados). Esto no era lo esperado, debido a que en el diseño de las construcciones utilizadas para generar las raíces transgénicas, la expresión de los cDNAs quiméricos (PvSymRK-GFP y GUS-GFP) está bajo el control transcripcional del promotor constitutivo 35S. En la figura 20 a-c se muestran imágenes de células de la epidermis de las raíces transgénicas que expresan PvSymRK-GFP, en las que se observa que la señal fluorescente detectada presenta un patrón típico de las proteínas de la membrana plasmática, similar a lo observado en células de tabaco agroinfiltradas que expresan esta proteína quimérica fluorescente (Fig. 19 a y b). Al igual que en las células de tabaco, en las células de la epidermis de las raíces transgénicas no es posible diferenciar

organelos como núcleo o vacuola. La señal fluorescente también se detectó en pelos radicales, objeto del presente trabajo, asociada a la membrana plasmática (Fig. 21 a-c). Considerando que en las raíces transgénicas, la transcripción del cDNA quimérico *PvSymRK-GFP* es de tipo constitutivo, es de esperar que las células corticales y otros tipos celulares internos de la raíz también expresen la proteína quimérica fluorescente *PvSymRK-GFP* con una distribución típica de proteínas de membrana plasmática. Sin embargo no se dispone de datos que lo sustenten pues, desafortunadamente, el grosor de las raíces no favorece la observación de tejido interno de raíz por microscopía en muestra fresca, por lo que no fue posible abordar la distribución de *PvSymRK-GFP* en tales células.

Con el propósito de tener un punto de comparación, se analizó la expresión y distribución de la proteína quimérica fluorescente *GUS-GFP* en diferentes tipos celulares de las raíces transgénicas correspondientes. En estas muestras, la señal fluorescente de *GUS-GFP* mostró una distribución citoplasmática, tanto en la epidermis de la raíz (Fig. 20 d), como en pelos radicales (Fig. 21 d y e), similar a lo observado en los experimentos de agroinfiltración de hojas de tabaco con la construcción *pH7FWG2-GUS7* (Fig. 19 c).

Del análisis comparativo de la distribución subcelular de estas proteínas quiméricas fluorescentes se sustenta que, tal como se deduce de su estructura primaria (presenta una secuencia péptido señal, un dominio transmembranal y carece de secuencia de destino o “sorting signal”), la parte *PvSymRK* de *PvSymRK-GFP* dirige a esta proteína quimérica fluorescente hacia la ruta secretoria y determina su inserción en la membrana plasmática. En contraste, y de conformidad a lo reportado en la literatura, la distribución difusa citoplasmática de *GUS-GFP* es la típica de una proteína carente de secuencia péptido señal y dominios transmembranales, lo que marca el destino citoplasmático de esta proteína quimérica fluorescente.

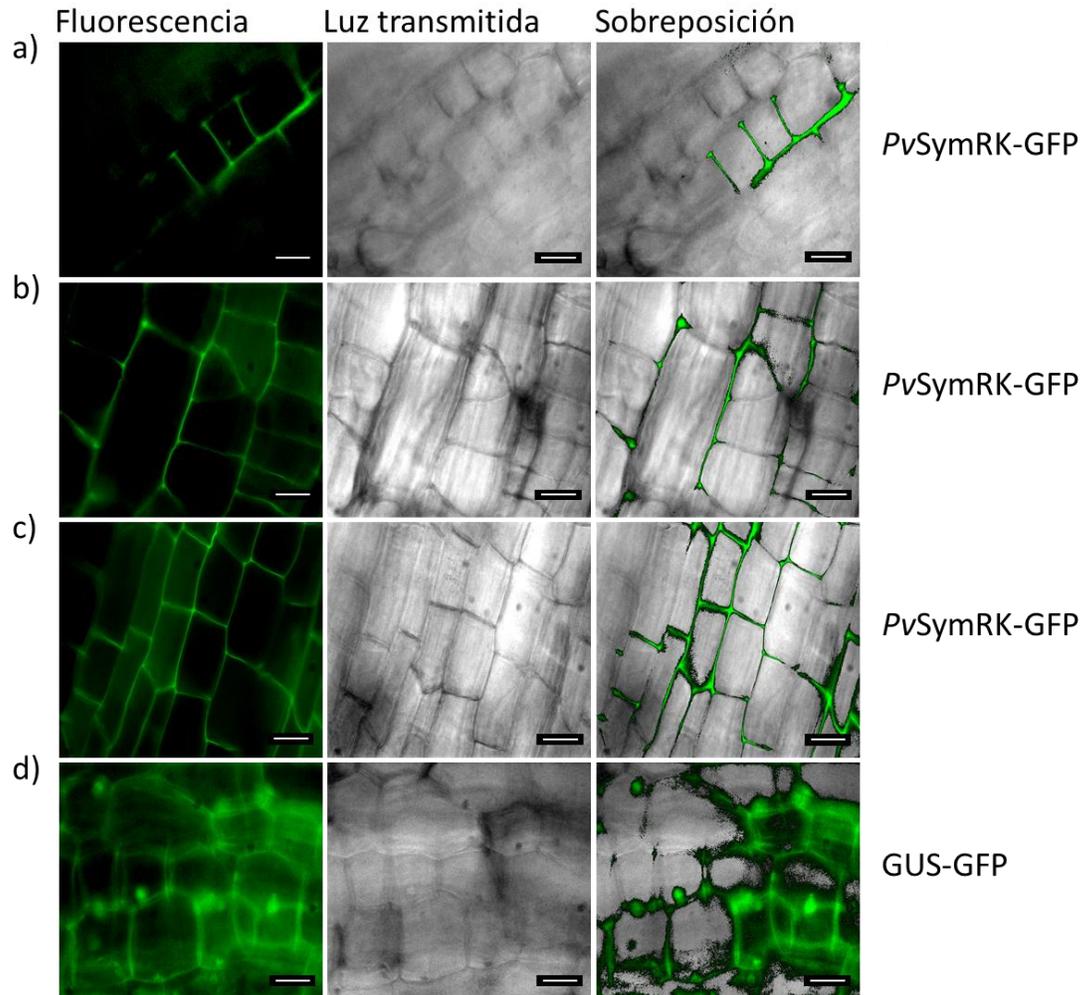


Fig. 20 Análisis por microscopía de epifluorescencia de células vivas de la epidermis de raíces transgénicas que expresan *PvSymRK-GFP* o *GUS-GFP*. Raíces transgénicas de plantas transformadas con *A. rhizogenes* K599 que porta: (a-c) pH7FWG2-5'*PvSymRK12* y (d) pH7FWG2-GUS7. La escala representa 20 μm . $n=3$.

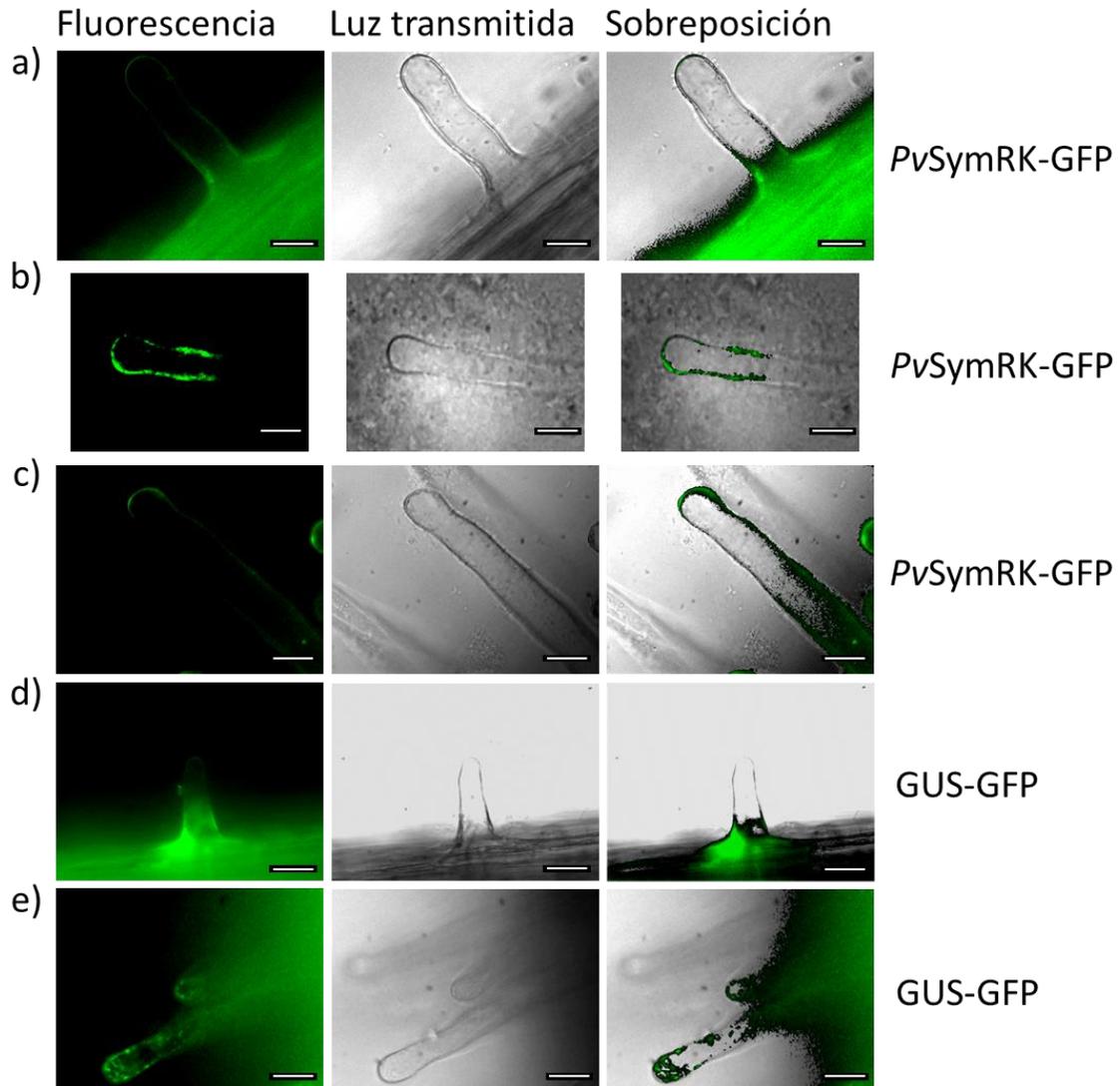


Fig. 21 Análisis por microscopía de epifluorescencia de pelos radicales vivos de raíces transgénicas que expresan *PvSymRK-GFP* o *GUS-GFP*. Raíces transgénicas de plantas transformadas con *A. rhizogenes* K599 que porta: (a-c) pH7FWG2-5' *PvSymRK12* y (d y e) pH7FWG2-*GUS7*. La escala representa 20 μm . $n= 3$.

La expresión de las proteínas *PvSymRK-GFP* y *GUS-GFP* en raíces transgénicas de frijol utilizando el sistema de generación de plantas compuestas, reportada por Estrada-Navarrete y colaboradores (2007), mostró ser exitosa, es decir, se observó la expresión de las proteínas fluorescentes y se determinó su distribución subcelular. Por lo cual, esta estrategia, se convierte en una herramienta muy útil

que permite el planteamiento de preguntas sobre las etapas tempranas de la interacción simbiótica, por ejemplo, cuál es el efecto de la incubación con factores Nod sobre la distribución de *PvSymRK* en los pelos radicales, tema del presente trabajo.

6.6 Análisis, por microscopía de epifluorescencia, del efecto de los factores Nod sobre la distribución de *PvSymRK-GFP* en pelos radicales de raíces transgénicas de frijol.

Raíces fluorescentes expresando *PvSymRK-GFP* y *GUS-GFP* se observaron al microscopio y se exploró la posibilidad de observar un cambio en la distribución de la fluorescencia en el pelo radical por efecto de la incubación con factores Nod (10^{-8} M). Para realizar este experimento, se buscaron pelos radicales fluorescentes, vivos y en crecimiento que presentaran flujo citoplasmático indicativo de células en óptimas condiciones para realizar el estudio de la respuesta a la incubación con factores Nod (Cárdenas *et al.*, 2000). Los pelos radicales que expresaban la proteína *GUS-GFP*, no presentaron modificación en el patrón citoplasmático de fluorescencia en respuesta al tratamiento con factores Nod. Solo se observó un ligero aumento en la intensidad de la fluorescencia a partir de 5 min de incubación con factores Nod y la cual se sostuvo hasta el final del experimento (Fig. 22). La fluorescencia se detectó durante todo el tiempo de exposición (~15 min), indicando que la proteína no sufrió foto-blanqueo ("*photobleaching*").



Fig. 22 Efecto de los factores Nod sobre la expresión y distribución de GUS-GFP. Secuencia de imágenes de fluorescencia de un pelo radical expresando GUS-GFP. La flecha indica el momento en que se incubó con factores Nod (10^{-8} M). Las imágenes sucesivas del pelo radical en observación fueron capturadas cada 10 segundos. La última imagen de la serie muestra el pelo radical en campo claro. $n=1$.

Con respecto a los pelos radicales que expresaron *PvSymRK-GFP*, una vez confirmado que la célula estaba en óptimas condiciones y que la intensidad de la fluorescencia asociada a la membrana plasmática fuera estable se procedió a

adicionar los factores Nod (10^{-8} M) y a capturar imágenes cada 10 segundos por un lapso de aproximadamente 15 min. Por experiencia en nuestro grupo y lo reportado en la literatura (Cárdenas *et al.*, 2000), en ese lapso de tiempo se presentan varias de las respuestas en pelos radicales de frijol asociadas a la percepción de los factores Nod (ver sección Introducción 1.7). Pocos segundos después de la incubación con factores Nod (Fig. 23, marcada con asterisco), se observó un cambio significativo en la distribución de la fluorescencia. Paulatinamente, disminuyó la fluorescencia asociada a la membrana plasmática y se detectó un patrón de fluorescencia punteado en el interior del pelo radical en la zona apical. Este patrón se mantuvo durante aproximadamente 6 minutos. Posteriormente, el patrón de fluorescencia punteado tiende a desaparecer para regresar a una distribución de la fluorescencia inicial, es decir, la mayoría de la fluorescencia está asociada a la membrana plasmática del pelo radical (Fig. 23). Si bien estos resultados son preliminares, y es importante confirmar su reproducibilidad, el análisis comparativo entre las imágenes obtenidas al observar la distribución de GUS-GFP y de PvSymRK-GFP indica un cambio transitorio en la distribución de PvSymRK-GFP en el pelo radical en respuesta a la incubación con factores Nod. Este patrón de re-distribución del receptor sugiere una respuesta celular, específica, de PvSymRK a la incubación con factores Nod que pudiera involucrar la inducción de un mecanismo de endocitosis de este receptor.

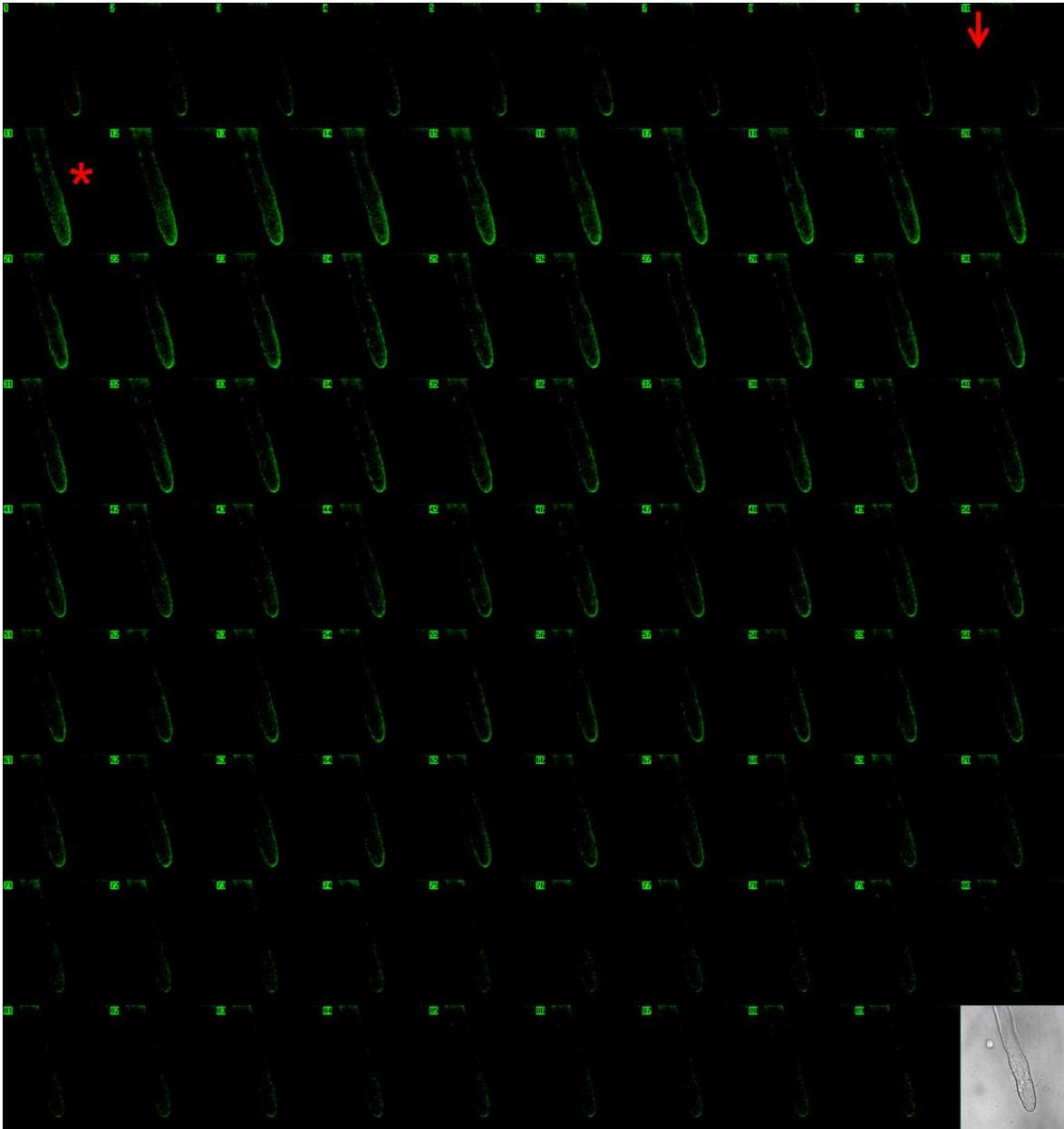


Fig. 23 Efecto de los factores Nod sobre la expresión y distribución de *PvSymRK-GFP*. Secuencia de imágenes de fluorescencia de un pelo radical expresando *PvSymRK-GFP*. La flecha indica el momento en que se adicionaron los factores Nod (10^{-8} M). El asterisco indica el momento en el que se observó un cambio en la distribución de *PvSymRK-GFP*. Las imágenes sucesivas del pelo radical en observación fueron capturadas cada 10 segundos. La última imagen de la serie muestra el pelo radical en campo claro. $n=1$.

7.- DISCUSIÓN

Con el propósito de ampliar nuestro conocimiento sobre la función del receptor *PvSymRK* durante las etapas tempranas de la simbiosis entre frijol y rhizobia, en el presente trabajo se describe un estudio novedoso sobre la expresión y distribución subcelular de *SymRK* en pelos radicales de frijol (como modelo de leguminosa), sitio de inicio de la nodulación con rhizobia. Fueron dos los abordajes experimentales en este estudio: 1) análisis de la expresión endógena de *PvSymRK* en pelos radicales por ensayos tipo qRT-PCR y Western blot y 2) expresión heteróloga de una quimera fluorescente *PvSymRK-GFP* y análisis de su distribución subcelular en pelos radicales vivos de raíces transgénicas de frijol.

El análisis por RT-qPCR mostró que el transcrito de *PvSymRK* es más abundante en muestras de pelos radicales de frijol que en raíz rasurada y en raíz completa. La acumulación del transcrito en pelos radicales es la primera evidencia experimental sobre la expresión del receptor en estas células y refuerza la noción de que *SymRK* juega un papel relevante en las etapas iniciales de la simbiosis frijol-rhizobia. En la literatura se ha analizado la acumulación del mensajero de *SymRK* en raíz completa de *M. truncatula* incubada con factores Nod, encontrándose que presenta un nivel constitutivo, y que la incubación con factores Nod no causa un cambio significativo en la acumulación del transcrito (Bersoult *et al.*, 2005). Sería interesante determinar si los niveles de expresión de *PvSymRK* en pelos radicales de frijol se modifican en respuesta a la incubación con factores Nod. Sin embargo, este tipo de estudios están a la espera de definir las condiciones experimentales de aislamiento de pelos radicales incubados en medio líquido. La presencia de *SymRK* en los pelos radicales se ha sugerido en la literatura ya que los pelos radicales de leguminosas mutantes en *SymRK* (*nod⁻*) perciben los factores Nod pero no presentan las respuestas subsecuentes, y además en esas mutantes la infección está bloqueada a nivel epidermal (Schneider *et al.*, 1999; Catoira *et al.*, 2000; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002). Por otro lado, el análisis de la actividad del promotor *MtDMI2* (3 Kb) sugiere que este gen se expresa en la epidermis, incluidos los pelos radicales, entre otros

tipos celulares de raíz de *M. truncatula* (Bersoult *et al.*, 2005). En el trabajo de Sánchez-López *et al.*, 2011, se reporta la inmunodetección de PvSymRK en la región de la epidermis y otros tipos celulares de primordio de nódulo (3 dpi) de frijol.

El presente trabajo reporta, por primera vez, evidencia sobre la expresión de la proteína SymRK en pelos radicales de frijol en plántulas de 2-4 dpv, es de hacer notar que este estudio requirió de un sistema de alta sensibilidad en la detección de señal (quimioluminiscencia) lo que sugiere que el receptor PvSymRK es poco abundante en pelos radicales; esto concuerda con la idea de que los receptores tipo cinasa de membrana plasmática suelen tener bajos niveles de expresión (Irani y Russinova, 2009). En este mismo ensayo también se detectaron otras bandas de ~60 y 40 KDa, respectivamente, cuya identidad no hemos confirmado, pero no se excluye la posibilidad de que sean productos de procesamiento del receptor PvSymRK.

Con respecto a la citolocalización de PvSymRK en pelos radicales, el análisis de su estructura primaria (ver Fig. 16) predice que se trata de un receptor tipo serina/treonina cinasa de membrana plasmática. Es decir, el mensajero de PvSymRK se traduce como una pre-proteína que porta una secuencia hidrofóbica tipo péptido señal en su extremo *N*-terminal, lo que determina su translocación co-traducciona a retículo endoplásmico y entrada a la ruta secretoria de proteínas. Una segunda característica de la estructura primaria de PvSymRK es la presencia de un dominio transmembranal, que indica que se trata de una proteína que se inserta en membrana. Por otro lado, no presenta secuencia de localización en organelos de la ruta secretoria (retículo endoplásmico y aparato de Golgi) por lo que se infiere que el destino de este receptor es la membrana plasmática. Respecto a la orientación de PvSymRK, la similitud entre la organización de su estructura primaria y la de otros receptores tipo serina/treonina cinasa de membrana plasmática, cuyo dominio cinasa está orientado hacia el entorno intracelular, se postula que PvSymRK al igual que sus ortólogos presenta la misma orientación. Con el objetivo de generar una herramienta molecular que nos

permita determinar la localización subcelular de *PvSymRK*, se generaron raíces transgénicas de frijol que expresan de manera constitutiva (bajo control del promotor 35S) un receptor quimérico fluorescente *PvSymRK-GFP* lo que facilita su análisis por microscopía de fluorescencia en células vivas. El análisis de la localización subcelular de *PvSymRK-GFP* se realizó tanto en hojas de tabaco agroinfiltradas, como en raíces transgénicas de frijol. Si bien los eventos de transformación no presentaron la eficiencia esperada, es decir, la expresión de la proteína quimérica sólo se detectó en secciones de hojas agroinfiltradas y de raíces transgénicas, debido probablemente a que refleje más de un evento aleatorio de inserción de cDNA en el genoma con posibilidad de inserción en regiones de regulación, el análisis minucioso de células vivas del pavimento de hojas de tabaco y de las células de la epidermis, incluyendo los pelos radicales, de raíces transgénicas de frijol mostró que *PvSymRK-GFP* se localiza en membrana plasmática, tal como se predice de su estructura primaria. Mientras que la proteína quimérica fluorescente control, GUS-GFP, presenta una distribución citoplasmática fácilmente distinguible del patrón que presenta *PvSymRK-GFP*. Es importante mencionar que la localización membranal de *PvSymRK-GFP* observada en este trabajo puede ser corroborada mediante co-localización utilizando marcadores membranales, también se pueden usar procedimientos bioquímicos como el aislamiento de membranas y posterior identificación de *PvSymRK-GFP* mediante Western blot usando anticuerpos específicos *anti-GFP*. La localización en membrana de *PvSymRK-GFP* observada en este trabajo es consistente con la localización en membrana plasmática observada en nódulos de *M. truncatula* reportado por Limpens *et al.*, 2005. Estos autores mostraron que la quimera *MtDMI2-GFP* presenta localización en la membrana plasmática de las células corticales y en la membrana del hilo de infección en nódulos de *M. truncatula*.

Con la herramienta molecular, expresión de *PvSymRK-GFP*, aplicada en el presente trabajo, hemos sido capaces de determinar la localización de este receptor y nos brindó la oportunidad de ser pioneros al plantear preguntas sobre el comportamiento de este receptor en las etapas tempranas de la interacción

simbiótica, por ejemplo, cuál es el efecto de la incubación de los pelos radicales con factores Nod sobre la distribución de PvSymRK-GFP. Preguntas tan relevantes como ésta aún no se han abordado en la literatura. Nuestros resultados preliminares sugieren que la incubación de pelos radicales transgénicos en presencia de factores Nod induce que la proteína quimérica PvSymRK-GFP, originalmente asociada a la membrana plasmática, se re-distribuya hacia el interior del pelo radical, en la zona apical, con un patrón punteado tipo vesicular, lo que abre la posibilidad de que esta re-distribución sea debida a un proceso endocítico. Este patrón de fluorescencia es notablemente distinto a la señal citoplasmática observada en pelos radicales que expresan GUS-GFP. Es de mencionar que el patrón de distribución citoplasmática de GUS-GFP no se modifica por la incubación de los pelos radicales con factores Nod. Estos resultados apoyan la hipótesis planteada en este trabajo, sobre la re-distribución subcelular de SymRK en respuesta a la percepción de los factores Nod, sin embargo, es importante enfatizar que hay que confirmar su reproducibilidad e incluir los controles experimentales adecuados como la incubación de pelos radicales en presencia de compuestos análogos a los factores Nod (*i.e.* pentámero de quitina; Cárdenas *et al.*, 2006) pero que no inducen las respuestas típicas del inicio de la simbiosis, o bien la incubación con otros elicitores (*i.e.* quitosan; Cárdenas *et al.*, 2006). La aparente re-distribución punteada de PvSymRK-GFP de la membrana plasmática hacia el entorno intracelular del pelo radical sugieren internalización del receptor vía endocitosis. En plantas se han reportado complejos de receptor-ligando que se internalizan vía endocitosis, entre ellos se encuentran un receptor cinasa con dominios ricos en leucina, BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BR1), y el receptor FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2). BR1 funciona en el desarrollo de la planta a través de la percepción de hormonas esteroideas tipo brasinosteroides (Kinoshita *et al.*, 2005) y FLS2 participa en la respuesta de defensa en plantas reconociendo a la proteína bacteriana, flagelina 22 (Chinchilla *et al.*, 2006). La endocitosis de BR1 es constitutiva (Rusznova *et al.*, 2004, Geldner *et al.*, 2007), mientras que la de FLS2 es dependiente de la interacción ligando-receptor (Robatzek *et al.*, 2006). Si bien estos son algunos ejemplos de endocitosis de

receptores en plantas, aún falta mucho por estudiar en este campo, como por ejemplo identificar las rutas de tráfico endocítico de estos receptores, proteínas de internalización, y destino del receptor (reciclaje, degradación o señalización intracelular) y mecanismos de regulación.

8.- CONCLUSIONES.

- El análisis de la acumulación del mensajero de *PvSymRK*, indicó que el transcrito es más abundante en pelos radicales de frijol, que en raíces rasuradas y ápices.
- Se detectó por primera vez, la presencia de la proteína *PvSymRK* en extractos totales de proteínas de pelos radicales de frijol de 2, 3 y 4 dpq.
- Se encontró que la proteína quimérica *PvSymRK-GFP* expresada en forma heteróloga se localiza en la membrana plasmática de células de hojas de tabaco agroinfiltradas y de células de la epidermis (incluyendo pelos radicales) de las raíces transgénicas de frijol correspondientes. La proteína quimérica *GUS-GFP* se distribuyó, homogéneamente, en el citoplasma tanto de las células del pavimento de tabaco como de la epidermis de las raíces transgénicas de frijol correspondientes.
- La incubación con factores Nod ocasionó la re-distribución de *PvSymRK-GFP* de la membrana plasmática hacia la región intracelular, lo cual sugiere internalización posiblemente por vesículas endocíticas en la zona apical de pelos radicales de raíces transgénicas de frijol. Mientras que no hubo un cambio aparente en la distribución de *GUS-GFP* después del tratamiento con factores Nod.

9.- PERSPECTIVAS.

- Realizar un análisis comparativo, tanto de la acumulación del transcrito como de la proteína *PvSymRK* en pelos radicales incubados en presencia de factores Nod.
- Llevar a cabo un análisis sistemático del efecto de los factores Nod sobre la distribución de *PvSymRK-GFP* en los pelos radicales de raíces transgénicas de frijol.
- Determinar la localización de *PvSymRK-GFP* en pelos radicales de frijol al inicio de la infección con rhizobia con particular énfasis en la formación del hilo de infección.
- Expresar la proteína *PvSymRK-GFP* bajo el control del promotor endógeno *PvSymRK* en raíces transgénicas de frijol para caracterizar su expresión y distribución espacio-temporal durante los eventos tempranos de infección.

10.- ANEXO 1.

-Inmunopurificación de anticuerpos *anti-PvSymRK* (anticuerpos *anti-CTER*).

Para aumentar la especificidad de la señal detectada por ensayos de Western blot se consideró necesario inmunopurificar anticuerpos *anti-PvSymRK* a partir del suero *anti-PvSymRK-CTER* (anticuerpos *anti-CTER*). Ello implicó un protocolo de cromatografía de inmunoafinidad que requiere de tres etapas experimentales: 1) conjugación del antígeno a un soporte tipo sefarosa 4B, 2) purificación de anticuerpos *anti-PvSymRK* (anticuerpos *anti-CTER*) por cromatografía de inmunoafinidad y 3) caracterizar los anticuerpos inmunopurificados.

El suero *anti-PvSymRK-CTER* fue generado por el Dr. David Jáuregui (miembro de nuestro grupo; resultados no publicados) utilizando la proteína quimérica recombinante Thio-CTER de aproximadamente 25 KDa, expresada en *E. coli*. Thio-CTER es una proteína quimérica cuyo extremo *N*-terminal (126 aa) corresponde a una versión mutagenizada de la proteína tiorredoxina (Thio) con capacidad de formar una estructura tipo HisPatch (Invitrogen), y esta fusionada a un segmento de 58 aminoácidos, CTER, (extremo *C*-terminal) que corresponde a una secuencia no conservada presente en el dominio intracelular tipo cinasa de *PvSymRK*. Dado que el antígeno (Thio-CTER) utilizado para generar estos anticuerpos es una proteína de fusión, en el suero existen dos poblaciones de anticuerpos: una población que reconoce epítopes presentes en el segmento CTER de *PvSymRK* y la otra que reconoce al segmento de Thio; lo que obliga a una estrategia de inmunopurificación por cromatografía diferencial seriada utilizando Thio como primer antígeno de captura (para eliminar los anticuerpos *anti-Thio*) y una segunda etapa de cromatografía de afinidad a Thio-CTER para así recuperar los anticuerpos específicos contra CTER (anticuerpos *anti-CTER*) (ver figura 24).

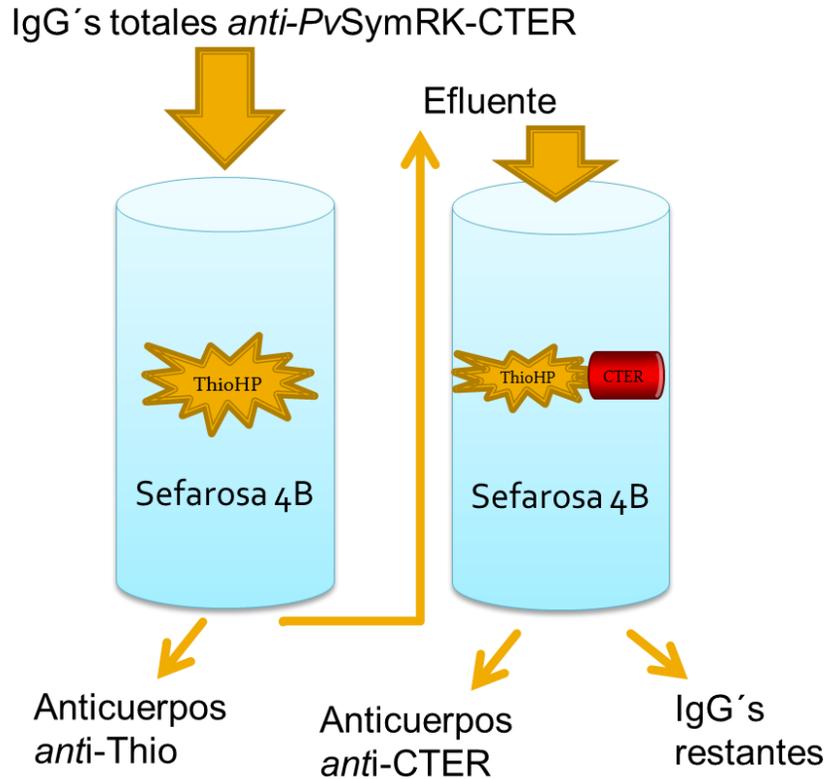


Fig. 24 Estrategia de inmunopurificación diferencial de anticuerpos *anti-CTER* y *anti-Thio*.

-Precipitación de inmunoglobulinas.

El suero es una mezcla compleja de proteínas, lípidos, entre otros, lo que puede comprometer la valoración por Western blot de la especificidad de los anticuerpos generados. Por lo que es altamente recomendable, eliminar todas las moléculas que puedan interferir durante la purificación de anticuerpos. Como primera fase en el procedimiento, se precipitaron las inmunoglobulinas totales (IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*) del suero *anti-PvSymRK-CTER* por el método estándar de precipitación con sulfato de amonio (50% saturación). El volumen en el que se resuspendieron las IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER* fue proporcional al volumen del suero de partida, lo que resultó en una suspensión, aquí referida como IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*.

1) Acoplar el antígeno a un soporte tipo sefarosa.

-Purificación de Thio-CTER.

Los primeros ensayos para purificar Thio-CTER mostraron que es una proteína insoluble y que se acumula como cuerpo de inclusión en *E. coli*. Con el propósito de obtener la proteína recombinante Thio-CTER soluble, se optimizaron las condiciones de expresión y purificación. La figura 25 recapitula los resultados obtenidos. Como primera modificación se optó por bajar la temperatura de inducción del cultivo a 30°C (inducido con 0.1 mM IPTG), ya que existen muchos reportes que indican que la expresión de proteínas recombinantes a temperaturas inferiores a 37°C (óptima para el cultivo de *E. coli*) favorece su expresión como proteína soluble. Una segunda modificación se refiere a las ventajas del método de purificación de proteínas por Choque Osmótico (His-Patch ThioFusion™, Invitrogen) ya que es el método más recomendado para purificar proteínas fusionadas a tiorredoxina y acumuladas de forma soluble en el espacio periplásmico. Sin embargo, tales modificaciones no brindaron los resultados esperados. Por un lado, la expresión de la proteína Thio-CTER a 30°C es considerablemente inferior a lo observado a 37°C (Fig. 25 carriles 3 y 4). Por otro lado, Thio-CTER, no se encontró en la fracción soluble resultante del choque osmótico (Fig. 25 carril 9), sino que esta proteína se acumuló en la fracción insoluble, es decir, como cuerpos de inclusión (Fig. 25 carril 10) (Wang, 2009). Como alternativa se exploró la posibilidad de purificar la proteína Thio-CTER a partir de cuerpos de inclusión aislados de cultivos inducidos a 37°C y, dado que el método por Choque Osmótico es laborioso, se optó por una estrategia tipo BugBuster™ (Novagen). El método BugBuster™ es un procedimiento comercial fácil y rápido para purificar proteínas solubles, que ofrece la alternativa de aislar cuerpos de inclusión con alto grado de pureza. Si bien la fracción soluble obtenida por este método parece contener la proteína Thio-CTER (Fig. 25 carril 6), ésta es mucho más abundante y mayoritaria en la fracción insoluble (Fig. 25 carril 7) o cuerpos de inclusión enriquecidos en Thio-CTER (no se excluye la presencia de otras proteínas contaminantes).

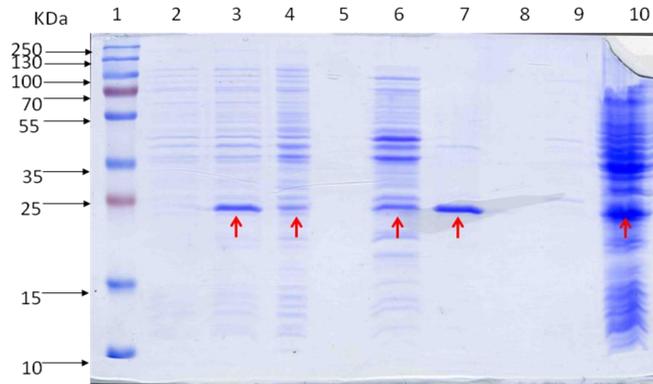


Fig. 25 Aislamiento de cuerpos de inclusión que contienen Thio-CTER a partir de cultivo inducido en presencia de IPTG 0.1mM. (1) Marcador de peso molecular de proteínas (KDa); extracto total de proteínas de: (2) cultivo no inducido; (3) cultivo inducido a 37°C y (4) cultivo inducido a 30°C. (5 y 8) Carriles vacíos; (6) fracción soluble obtenida por el método de BugBuster™ a partir de cultivo inducido a 37°C; (7) cuerpos de inclusión aislados por el método BugBuster™ a partir de cultivo inducido a 37°C; (9) fracción soluble obtenida por el método Choque Osmótico a partir de cultivo inducido a 30°C; (10) fracción insoluble obtenida por el método de Choque Osmótico a partir de cultivo inducido a 30°C. SDS-PAGE 12%, tinción con azul de Coomassie.

Con el fin de optimizar la solubilización de los cuerpos de inclusión enriquecidos en Thio-CTER utilizando condiciones compatibles con el acoplamiento de esta proteína a sefarosa 4B, se realizaron pruebas de solubilidad en presencia de concentraciones crecientes de urea. Los resultados indicaron que la proteína Thio-CTER se solubiliza a partir de 2 M urea, siendo totalmente soluble en presencia de 4M urea.

-Purificación de tiorredoxina.

El segundo antígeno necesario para realizar la cromatografía de inmunoafinidad diferencial es la tiorredoxina (Thio). La expresión de Thio en *E. coli* se indujo bajo condiciones estándar (en presencia de 0.1 mM IPTG a 37°C durante 4 h); y la proteína se purificó utilizando el método de Choque Osmótico, por ser el método más fácil y rápido para purificar proteínas del espacio periplásmico. La proteína de

12.8 KDa correspondiente a Thio se obtuvo mayoritariamente en la fracción soluble (Fig. 26 carril 9, marcada con asterisco), aunque también se observaron otras proteínas de mayor peso molecular. Como se verá más adelante, estas proteínas no son reconocidas por IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*; sin embargo no se descarta que para experimentos futuros se tenga que purificar Thio por cromatografía de afinidad a níquel.

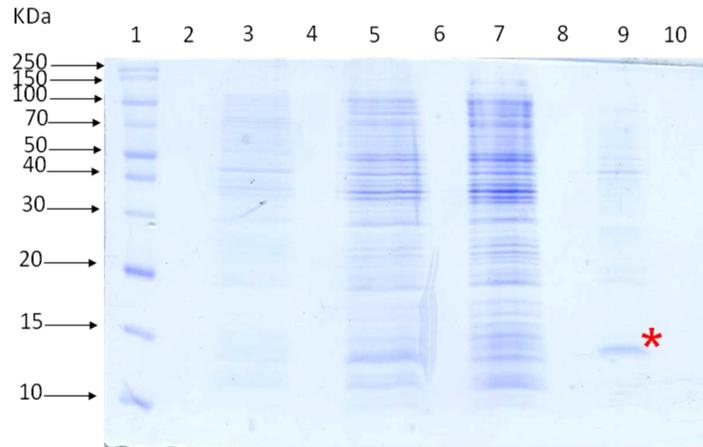


Fig. 26 Purificación de tiorredoxina por Choque Osmótico. (1) Marcador de peso molecular de proteínas (KDa); (2, 4, 6, 8, 10) carril vacío; (3) cultivo no inducido; (5) cultivo inducido; (7) fracción insoluble del Choque Osmótico; (9) fracción soluble del Choque Osmótico. SDS-PAGE 15%, tinción con azul de Coomassie. El asterisco indica a tiorredoxina en la fracción soluble.

Previo a la cromatografía de inmunoafinidad, y con el fin de determinar la especificidad de los anticuerpos contra la proteína Thio-CTER (y posibles contaminantes) solubilizada en 4M urea y contra la proteína Thio, se realizó un ensayo tipo Western blot utilizando diferentes cantidades de las fracciones enriquecidas en Thio-CTER y en Thio; como primer anticuerpo se usó la fracción de IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*. El resultado mostró que la fracción de IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER* reconoce tanto a la proteína Thio-CTER (Fig. 27 a) como a la proteína Thio (Fig. 28 a), así como algunas proteínas contaminantes minoritarias. Por otro lado se repitió el Western blot bajo las mismas condiciones pero esta vez la fracción de IgG's totales *anti-PvSymRK-*

CTER fue competida con 135 μg de la fracción de tiorredoxina durante 1 h antes de ser utilizada como primer anticuerpo. El resultado mostró que la proteína Thio-CTER continúa siendo reconocida (Fig. 27 b) aunque con menor intensidad mientras la proteína Thio no es detectada (Fig. 28 b) al igual que las proteínas contaminantes. Si bien la especificidad de los anticuerpos no es cuantificable por Western blot, los resultados de las Figs. 27 y 28 sugieren que los anticuerpos *anti*-Thio presentes en la fracción IgG's totales *anti*-PvSymRK-CTER son menos abundantes que los anticuerpos *anti*-CTER.

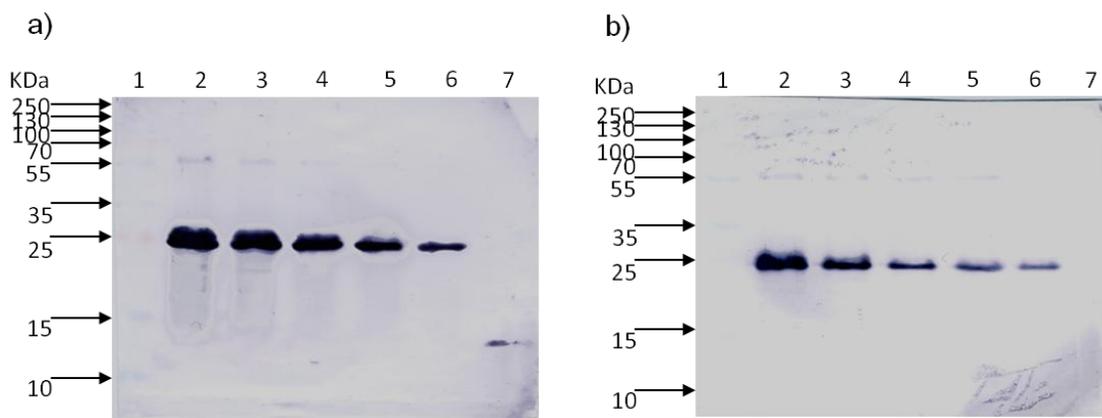


Fig. 27 Análisis de la especificidad de la fracción de IgG's totales *anti*-PvSymRK-CTER por la proteína Thio-CTER, mediante ensayo tipo Western blot utilizando como anticuerpo primario: (a) IgG's totales *anti*-PvSymRK-CTER, (b) IgG's totales *anti*-PvSymRK-CTER competido con 135 μg de tiorredoxina, ambos casos dilución 1:500. Muestras en carriles: (1) Marcador de peso molecular de proteínas (KDa); (2) 4 μg , (3) 2 μg , (4) 1 μg , (5) 0.5 μg , (6) 0.25 μg de Thio-CTER respectivamente y (7) 2.4 μg de Thio.

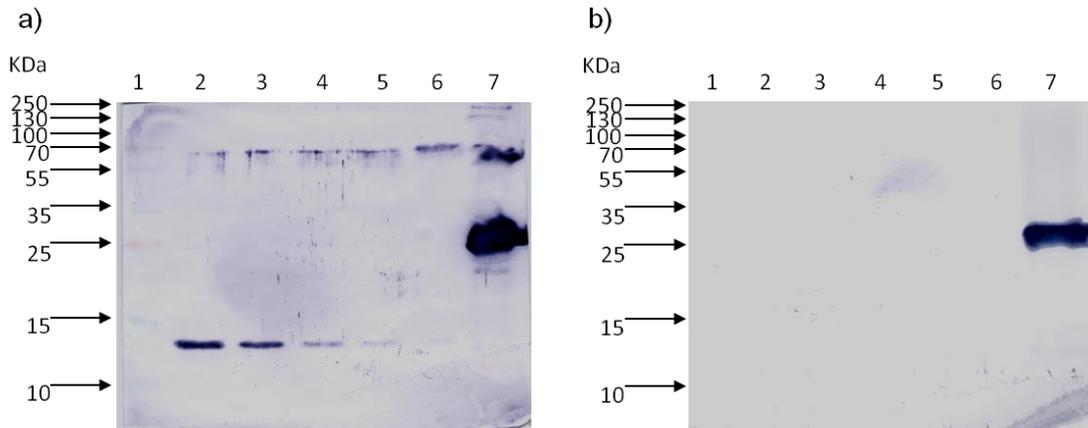


Fig. 28 Análisis de la especificidad de la fracción IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER* por la proteína Thio mediante ensayo tipo Western blot, utilizando como anticuerpo primario: (a) IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*, (b) IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER* competido con 135 µg de tiorredoxina, ambos casos dilución 1:500. Muestras en carriles: (1) Marcador de peso molecular de proteínas (KDa); (2) 2.4 µg, (3) 1.2 µg, (4) 0.6 µg, (5) 0.3 µg, (6) 0.15 µg de Thio respectivamente y (7) 4 µg de Thio-CTER.

2) Purificación de los anticuerpos *anti-PvSymRK-CTER* (anticuerpos *anti-CTER*) por cromatografía de inmunoafinidad.

La cromatografía de inmunoafinidad se llevó a cabo reciclando 5 veces consecutivas 7 ml de la suspensión de IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*, primero por la columna de sefarosa-Thio, para eliminar los anticuerpos *anti-Thio* de la suspensión de IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER*. El efluente resultante se recicló por una segunda columna de sefarosa-Thio-CTER para retener los anticuerpos que reconocen a CTER (anticuerpos *anti-CTER*). Cada columna se procesó independientemente para eluir los anticuerpos *anti-Thio* y *anti-CTER*. En la figura 29 se muestran los cromatogramas correspondientes. Ambas cromatografías presentan un pico de elución que inicia en la fracción 15, con un máximo de densidad óptica en la fracción 16 o 18, que corresponden a los anticuerpos *anti-Thio* y *anti-CTER* inmunopurificados, respectivamente.

Cromatografía de inmunoafinidad

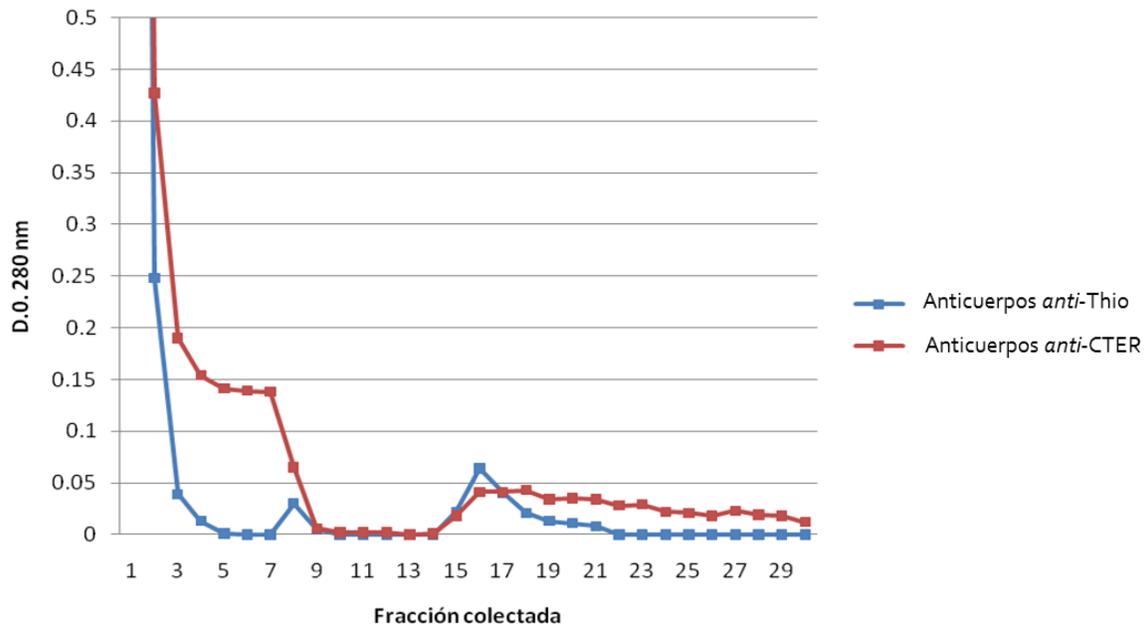


Fig. 29 Cromatografía de inmunoafinidad. Fracciones 1 a 7 lavado con 0.1 M de TrisHCl pH 8; fracciones 8 a 14 lavado con 0.1 M Tris HCl-0.5 M NaCl pH 8; fracciones 15 a 30 elución con 0.1 M de ácido acético. La línea azul corresponde a anticuerpos *anti*-Thio y la línea roja a anticuerpos *anti*-CTER.

3) Caracterización de anticuerpos *anti*-CTER inmunopurificados.

La caracterización de la fracción 16 o 18 con anticuerpos *anti*-Thio y *anti*-CTER respectivamente, se llevó a cabo en ensayo tipo Western blot con las proteínas purificadas tiorredoxina de 12.8 KDa y Thio-CTER de 25 KDa. La fracción 16 (anticuerpos *anti*-Thio) reconocen tanto a Thio como a Thio-CTER (Fig. 30 b), (ambas contienen la secuencia tiorredoxina). En cambio la fracción 18 (anticuerpos *anti*-CTER) sólo reconoce a la proteína Thio-CTER (Fig. 30 c). Como control se llevó a cabo una réplica de Western blot incubado con IgG's totales *anti*-PvSymRK-CTER, en donde ambas proteínas son reconocidas (Fig. 30 a). En los tres casos se detectó una proteína de ~55 KDa, probablemente una proteína contaminante inespecífica que tiene reacción cruzada con los anticuerpos.

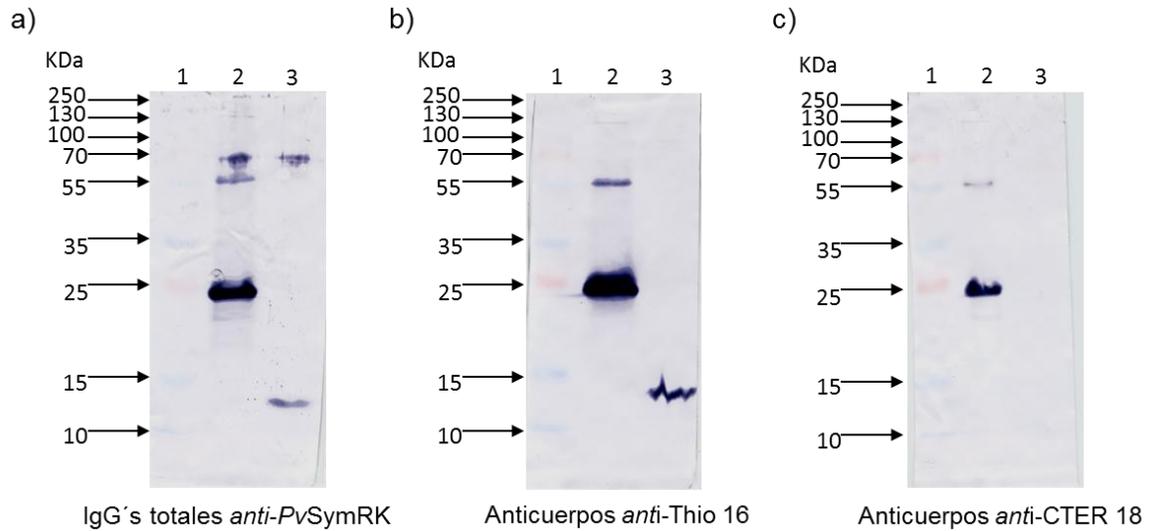


Fig. 30 Análisis de especificidad de anticuerpos inmunopurificados. Western blot incubado con: (a) IgG's totales *anti-PvSymRK-CTER* (dilución 1:500), (b) anticuerpos *anti-Thio* (fracción 16, dilución 1:50), (c) anticuerpos *anti-CTER* (fracción 18, dilución 1:50). Muestras en carriles: (1) Marcador de peso molecular de proteínas (KDa); (2) 500 ng de Thio-CTER; (3) 1.5 µg de Thio.

Para determinar la cantidad mínima de Thio-CTER detectada por los anticuerpos *anti-CTER* inmunopurificados (fracción 18) se realizó ensayo tipo Western blot con concentraciones decrecientes de proteína Thio-CTER. El resultado mostró que 10 ng de Thio-CTER son detectados de manera apenas perceptible, mientras que la detección de 100 ng de Thio-CTER es inequívoca (Fig. 31).

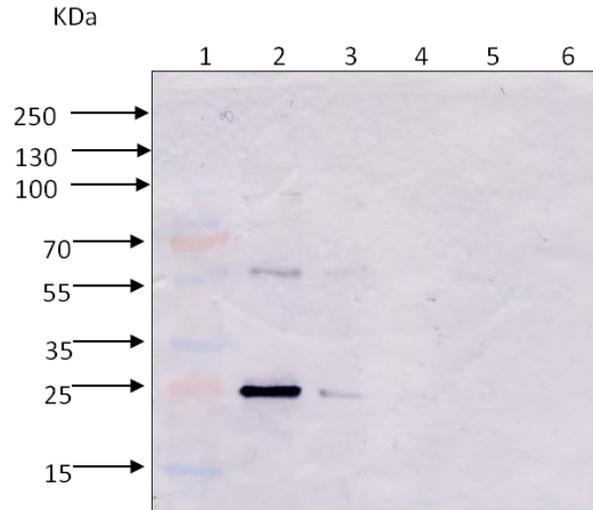


Fig. 31 Determinación de la concentración mínima de Thio-CTER detectada por la fracción 18 de anticuerpos *anti*-CTER (dilución 1:50). (1) Marcador de peso molecular de proteínas (kDa); (2) 500 ng; (3) 100 ng; (4) 10 ng; (5) 1 ng; (6) 0.1 ng de Thio-CTER, respectivamente.

Protocolos

a) Inducción de la expresión de proteínas recombinantes. Las cepas de *E. coli* XL-BLUE, previamente transformadas con los plásmidos Thiorredoxina y Thio-CTER, se crecen en 3 ml de medio LB con el antibiótico apropiado, a 37°C, toda la noche y con agitación constante. Posteriormente, se transfieren 500 µl de este cultivo a 100 ml de medio LB fresco con antibiótico y se incuba a 37°C con agitación constante. Cuando el cultivo alcanza una DO_{600nm} de 0.6-0.7 unidades (en aproximadamente 2-3 h), se induce la expresión de la proteína recombinante en presencia de 0.1 mM de IPTG durante 4 h y posteriormente se toma la lectura de densidad óptica a 600 nm. El cultivo se centrifuga a 5000 rpm (Microcentrífuga Eppendorf 5418) durante 10 min a 4°C y la pastilla bacteriana se procesa de inmediato para purificar proteína (utilizando alguno de los métodos descritos en los incisos b-d, según lo requiera el experimento) o se conserva a -20°C, según corresponda.

b) Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a níquel. Las proteínas recombinantes con etiqueta de poli-histidina (His_{6X} o Histidine Patch) son purificadas bajo el principio de cromatografía de afinidad en un soporte inerte de níquel (Ni-NTA agarosa, QUIAGEN). La afinidad del ligando (en este caso Histidine Patch) por níquel disminuye cuando compete con imidazol. Brevemente, el cultivo previamente inducido, se centrifuga a 5000 rpm (Microcentrífuga Eppendorf 5418) durante 10 min a temperatura ambiente, se determina el peso seco de la pastilla y se resuspende en solución BugBuster (BugBuster™ Protein Extraction Reagent, Novagen; 5 ml por g de pastilla) suplementada con 25 unidades de nucleasa tipo Benzonasa (Novagen). La suspensión se incuba a temperatura ambiente durante 20 min con agitación suave y constante, hasta perder viscosidad. Posteriormente se centrifuga a 20200 g durante 10 min a 4°C (Centrífuga Sorvall SS34). El sobrenadante, o fracción soluble, contiene tanto las proteínas de protoplasma solubles como las del espacio periplásmico. La fracción insoluble corresponde a membranas bacterianas y, de ser el caso, cuerpos de inclusión. Las fracciones se procesan de inmediato o se guardan a -80°C. Para la cromatografía de afinidad, la fracción con proteína soluble se mezcla con Ni-NTA agarosa, previamente equilibrada en buffer BugBuster y se deja en contacto durante 1 h (cromatografía en batch), para posteriormente lavar con PBS-imidazol (20-40 mM) y eluir con PBS-imidazol (200-500 mM). A lo largo de la cromatografía se colectan fracciones que son analizadas por SDS-PAGE con el propósito de identificar la(s) fracción(es) enriquecida(as) en la proteína recombinante de interés. La composición de PBS es 136.7 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.14 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4.

c) Purificación de proteínas recombinantes por el método de Choque Osmótico (ThioFusion™, Invitrogen), purificación de Tiorredoxina (Thio). La pastilla del cultivo bacteriano inducido es resuspendida directamente en solución de choque osmótico # 1 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 2.5 mM EDTA y 20% sacarosa), en un volumen que se calcula utilizando la fórmula $V_R = (DO_{600nm} \text{ al final de la inducción} / 5) \times \text{volumen inicial del cultivo}$. La suspensión bacteriana se incuba en

hielo durante 10 min y se centrifuga a 20200 g durante 1 min a 4°C. La pastilla se resuspende en solución de choque osmótico # 2 (20 mM Tris-HCl, pH 8, 2.5 mM EDTA) utilizando el volumen antes calculado y se incuba en hielo por 10 min, seguido de centrifugación a 20200 g durante 10 min a 4°C. Se colecta el sobrenadante resultante, que contiene las proteínas del espacio periplásmico. La pastilla resultante, correspondiente a la fracción insoluble del extracto de proteínas, se resuspende en solución de choque osmótico # 2 utilizando el mismo volumen antes calculado. Se toman alícuotas de ambas muestras para análisis en SDS-PAGE y el remanente se guarda a -80°C.

d) Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión que contienen ThioCTER. La fracción insoluble del inciso b se resuspende en solución BugBuster (mismo volumen que en inciso b) suplementado con lisozima (200 µg/ml; Novagen), se agita vigorosamente e incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregan 6 volúmenes de solución BugBuster (diluido 1:10) y se agita vigorosamente durante un minuto. Posteriormente se centrifuga a 20200 g durante 15 min a 4°C y se descarta el sobrenadante. La pastilla se resuspende en solución BugBuster (diluido 1:10; 0.5 volúmenes respecto al empleado en inciso b), se agita (usar vórtex) y se centrifuga a 20200 g durante 15 min a 4°C; este paso se repite 2 veces. Los cuerpos de inclusión presentes en la pastilla se resuspenden en PBS 1X y se solubilizan en presencia de urea, agente caotrópico. Para encontrar la concentración mínima de urea a la cual se solubilizan los cuerpos de inclusión se realizan pruebas de solubilidad en presencia de concentraciones crecientes de urea, como a continuación se describe: se toma una alícuota (250 µl) de la suspensión de cuerpos de inclusión y se centrifuga a 20200 g durante 1 min; la pastilla se resuspende en 250 µl de 1 M urea en buffer fosfatos, 20 mM, pH 7.4. Se agita (usar vórtex) durante 2 min y se centrifuga a 20200 g durante 5 min. Se colecta el sobrenadante para análisis en SDS-PAGE y la pastilla se resuspende en 250 µl de 2 M urea en buffer fosfatos, 20 mM, pH 7.4. Este proceso se repite sucesivamente usando 4, 6 y 8 M urea. Se analiza cada fracción por SDS-PAGE.

Se considera como óptima, la concentración de urea a la que se solubiliza el total de los cuerpos de inclusión.

e) Purificación de IgG's. Las inmunoglobulinas (IgG's) presentes en el suero *anti-PvSymRK-CTER* se precipitan en presencia de sulfato de amonio (50% de saturación). La pastilla precipitada se resuspende (1 volumen de suero) y dializa contra PBS 1X en relación 1:100 (v:v) durante 1 h a temperatura ambiente. La diálisis se repite 2 veces. Para la diálisis se utiliza una membrana de celulosa (MWCO 12,000-14,000, Spectra). La concentración de IgG's dializada se determina por espectrofotometría a 280nm (NanoDrop 2000c, ThermoScientific).

f) Acoplamiento de proteínas Thio y Thio-CTER a sefarosa 4B-CNBr. Se activan 0.15 g de sefarosa 4B-CNBr (Sigma) en 50 ml de 1 mM HCl. Inmediatamente después se filtran a través de papel Whatmann y se lavan con 50 ml de 1 mM HCl. Se mezcla la sefarosa activada con 1 mg de proteína Thio recombinante soluble o Thio-CTER solubilizada en urea 4 M (ver inciso d) y dializada contra 100 mM NaHCO₃-urea 4 M, pH 9.2. Se deja acoplando en agitación suave durante 16 h a temperatura ambiente. El rendimiento del acoplamiento se determina por la diferencia entre la DO_{280nm} inicial de la suspensión de proteína recombinante y la DO_{280nm} final, es decir, del sobrenadante *post*-acoplamiento, en donde:

$$\% \text{ acoplamiento} = 100\% - \frac{(\text{DO}_{280\text{nm}} \text{ final} \times 100)}{\text{DO}_{280\text{nm}} \text{ inicial}}$$

Por último, los grupos de sefarosa residuales se inactivan con 100 µl de 1 M Tris HCl, pH 8 por cada ml de mezcla de reacción.

g) Purificación de anticuerpos anti-CTER por cromatografía de inmunoafinidad. Para purificar anticuerpos *anti-CTER* se pasa la suspensión de IgG's *anti-PvSymRK-CTER* por una primera columna, sefarosa-Thio (para eliminar los anticuerpos *anti-Thio*) pre-equilibrada en 100 mM Tris HCl, pH 8. El efluente resultante se pasa por una segunda columna, sefarosa-Thio-CTER. Se lava la

columna sefarosa-Thio-CTER con 10 ml de 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 10 ml de 100 mM Tris-HCl-150 mM NaCl, pH 8.0. Se colectan fracciones de 1.5 ml. Los anticuerpos específicos *anti*-CTER se eluyen con 5 ml de 100 mM ácido acético y se colectan fracciones de 650 μ l que inmediatamente se neutralizan con 350 μ l de Tris HCl 0.1 M pH 8. Se mide la DO_{280nm} de cada fracción colectada y se grafican los valores para determinar la(s) fracción(es) que contienen los anticuerpos específicos y se procede a calcular su concentración. Este mismo procedimiento se aplica para recuperar los anticuerpos *anti*-Thio retenidos en la primera columna (sefarosa-Thio).

11.- LITERATURA CITADA.

1. Afzal, AJ., Wood, AJ., Lightfoot, DA. (2008). **Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense.** *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 21:507-517.
2. Ané, JM., Kiss, GB., Riely, BK., Penmetsa, RV., Oldroyd, GE., Ayax, C., Lévy, J., Dénarié, J., Cook, DR. (2004). ***Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legume.** *Science.* 303:1364-1367.
3. 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* Lysine motif-receptor-like kinase gene family includes *NFP* and new nodule-expressed genes.** *Plant Physiology.* 142:265-279.
4. Baluska, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Samaj, J., Chua, NH., Barlow, PW., Volkmann, D. (2000). **Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges.** *Developmental Biology.* 227:618-32.
5. Bassett, CL., Nickerson, ML., Cohen, RA., Rajeevan, MS. (2000). **Alternative transcript initiation and novel *post*-transcriptional processing of a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase gene that responds to shortday photoperiodic floral induction in morning glory (*Ipomoea nil*).** *Plant Molecular Biology.* 43:43-58.
6. Bateman, A. y Bycroft, M. (2000). **The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD).** *Journal of Molecular Biology.* 16:1113-9.
7. Bernhardt, C., Lee, MM., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A., Schiefelbein, J. (2003). **The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root.** *Development.* 130:6431-6439.
8. Bersoult, A., Camut, S., Perhald A., Kereszt, A., Kiss, G., Cullimore, J. (2005). **Expression of the *Medicago truncatula* *DMI2* gene suggests roles of the symbiotic nodulation receptor kinase in nodules and during early nodule development.** *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 18:869-876.

9. Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, PS., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., Papa, R. (2011). **Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109:1-9.
10. 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
11. Borisov, AY., Madsen, LH., Tsyganov, VE., Umehara Y., Voroshilova, VA., Batagov, AO., Sandal, N., Mortensen, A., Schauser, L., Ellis, N., Tikhonovich, IA., Stougaard, J. (2003). **The *Sym35* gene required for root nodule development in pea is an ortholog of *Nin* from *Lotus japonicus*.** *Plant Physiology.* 131:1009-1017.
12. Brechenmacher, L., Lee, J., Sachdev, S., Song, Z., Nguyen, T., Joshi, T., Oehrle, N., Libault, M., Mooney, B., Xu, D., Cooper, B., Stacey, G. (2009). **Establishment of a protein reference map for soybean root hair cells.** *Plant Physiology.* 149:670-682.
13. Broughton, W.J. y Dilworth, M.J. (1971). **Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans.** *Biochemical Journal.* 125:1075-1080.
14. Campanoni, P. y Blatt, MR. (2007). **Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes.** *Journal Expedient of Botany.* 58:65-74.
15. Capoen, W., Goormachtig, S., De Rycke, R., Schoroyers, K., Holsters, M. (2005). **SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102:10369-10374.
16. Cárdenas, L., Alemán, E., Navá, N., Santana, O., Sánchez, F., Quinto, C. (2006). **Early responses to nod factors and mycorrhizal colonization in a non-nodulating *Phaseolus vulgaris* mutant.** *Planta.* 223:746-754.
17. Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I., Lutenberg, B., Spaink, H., Rademaker, G., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J. (1995). **Isolation, chemical structures and biological activity of lipochitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*.** *Plant Molecular Biology.* 29:453-464.

18. Cárdenas, L., Feijó, J., Kunke, J., Sánchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P., Quinto, C. (1999). **Rhizobium Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs.** *Plant Journal*. 19:347-352.
19. Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, TL., Sánchez, F., Quinto, C. Feijó, JA., Kunkel, JG., Hepler, PK. (2000). **Ion changes in legume root hairs responding to nod factors.** *Plant Physiology*. 123:443-452.
20. 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 Journal*. 56:802-813.
21. 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 etli* nodulation signals.** *Plant Physiology*. 116:871-877.
22. Carol, RJ. y Dolan, L. (2002). **Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 357:815-821.
23. Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, RV., Journet, E., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., Denario, J. (2000). **Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway.** *Plant Cell*. 12:1647-1666.
24. Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., Parniske, M. (2008). **Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis.** *Plant Cell*. 20:3467-3479.
25. Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G. (2006). **The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception.** *Plant Cell*. 18:465-476.
26. Clark, SE., Williams, RW., Meyerowitz, EM. (1997). **The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*.** *Cell*. 89:575-585.
27. Clay, NK. y Nelson, T. (2002). **VH1, a provascular cell-specific receptor kinase that influences leaf cell patterns in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*. 14:2707-2722.

28. D'Aoust, MA., Lavoie, PO., Belles-Isles, J., Bechtold, N., Michèle, M., Vézina, LP. (2008). **Transient expression of antibodies in plants using syringe Agroinfiltration.** *Recombinant Proteins From Plants: Methods and Protocols* (Loïc, F., and Véronique, G., Eds.). 41–50.
29. Dart, PJ. (1977). **Infection and development of leguminous nodules.** *A treatise on dinitrogen fixation* (Ed. By R. W. F. Hardy). Wiley New York. 367-472.
30. Dávila, R. (2009). **Caracterización celular y molecular de una línea mutante de *Phaseolus vulgaris* (R69) afectada en el proceso de nodulación.** Tesis de Licenciatura. Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México.
31. de-Bruijn, FJ y Downie, A. (1991). **Biochemical and molecular studies of symbiotic nitrogen fixation.** *Current Opinion in Biotechnology.* 2:184-192.
32. Dehio, C. y de-Bruijn, FJ. (1992). **The early nodulin gene *SrENOD2* from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin.** *Plant Journal.* 2:117-128.
33. Dénarie, J y Cullimore, J. (1993). **Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis.** *Cell.* 74:951-954.
34. Dénarie, J., Debelle, F., Promé, JC. (1996). ***Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis.** *Annual Review of Biochemistry.* 65:503-535.
35. DeRuijter, NCA., Rook, MB., Bisseling, T., Emons, AMC. (1998). **Lipochitooligosaccharides re-initiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip.** *Plant Journal.* 13:341-350.
36. Diévert, A. y Clark, SE. (2004). **LRR-containing receptors regulating plant development and defense.** *Development.* 131:251-261.
37. Dolan, L. y Costa, S. (2001). **Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis.** *Journal of Experimental Botany.* 52:413-417.
38. Dolan, L., Duckett, C., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C., Roberts, K. (1994). **Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*.** *Development.* 120:2465-74.

39. Downes, B. y Vierstra, RD. (2005). **Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags.** *Biochemical Society Transactions.* 33:393-399.
40. Downie, JA y Walker, SA. (1999). **Plant responses to nodulation factors.** *Current Opinion in Plant Biology.* 2:483-489.
41. Endre, G., Kereszt, A., Kevel, Z., Mihaea, S., Kaló, P., B, György. (2002). **A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development.** *Nature.* 417:962-966.
42. Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, JE., Guillen, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, PM., Sanchez, F. (2007). **Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*.** *Nature Protocols.* 2:1819-1824.
43. Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, JE., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillen, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, DX., Gresshoff, PM., Sánchez, F. (2006). ***Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: A tool for functional genomics.** *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 19:1385-1393.
44. 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.
45. Fournier, J., Timmers, ACJ., Sieberer, BJ., Jauneau, A., Chabaud, M., Barker, DG. (2008). **Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization.** *Plant Physiology.* 148:1985-1995.
46. Galway, ME., Masucci, JD., Lloyd, AM., Walbot, V., Davis, RW., Schiefelbein, JW. (1994). **The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root.** *Development Biology.* 166:740-754.
47. Geldner, N., Hyman, DL., Wang, X., Schumacher, K., Chory, J. (2007). **Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1.** *Genes Development.* 21:1598-1602.
48. Gherbi, H., Markmann, K., Svistoonoff, S. (2008) **SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbiosis with arbuscular**

- mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankia bacteria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105:4928-4932.
49. Gilroy, S. y Jones, D. (2000). **Through form to function: root hair development and nutrient uptake.** *Trends in Plant Science.* 5:56-60.
50. Gomez-Gomez, L. y Boller, T. (2000). **FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*.** *Molecular Cell.* 5:1003-1011.
51. Gough, C. (2003) ***Rhizobium* symbiosis: Insight into nod factor receptors.** *Current Biology.* 13:973-975.
52. Guillaume, A., Kees, L., Pascal, H., Yves, FD. (2008). **Detection and localization of single LysM-Peptidoglycan interactions.** *Journal of Bacteriology.* 190: 7079-86.
53. Guilmin, S. y Dunand, C. (2006). **Patterning of *Arabidopsis* epidermal cell: epigenetic factors regulate the complex epidermal cell fate pathway.** *Trends in Plant Science.* 11:601-609.
54. Haney, CH. y Long, SR. (2010). **Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 107:478-483.
55. Hanks, SK. y Quinn, AM. (1991). **Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members.** *Methods Enzymology.* 200:38-61.
56. Hecht, V., Vielle-Calzada, JP., Hartog, MV., Schmidt, ED., Boutilier, K., Grossniklaus, U., de Vries, SC. (2001). **The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture.** *Plant Physiology.* 127:803-816.
57. Heidstra, R., Yang, WC., Yalcin, Y., Peck, S., Emons, AM. (1997). **Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction.** *Development.* 124:1781-1787.
58. Herman, EM y Lamb, CJ. (1992). **Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies.** *Plant Physiology.* 98:264–272.

59. Hirsch, A. (1992). **Developmental biology of legume nodulation.** *New Phytologist*. 122:211-237.
60. Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J.A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G.J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M., Hayashi, M. (2005). **Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots.** *Nature*. 433:527-531.
61. Indrasumunar, A. (2007) **Molecular cloning and functional characterization of soybean (*Glycine max* L.) nod factor receptor genes,** PhD Thesis, The University of Queensland.
62. Indrasumunar, A., Kereszt, A., Searle, I., Miyagi, M., Li, D., Nguyen, C.D.T. (2009). **Inactivation of duplicated Nod-Factor Receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.).** *Plant Cell Physiology*. 10:1093-178.
63. Irani, N.G., y Russinova, E. (2009). **Receptor endocytosis and signaling in plants.** *Current Opinion in Plant Biology*. 12:653-659.
64. Ishida, T., Kurata, T., Okada, K., Wada, T. (2008). **A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs.** *Annual Review of Plant Biology*. 59:365-386.
65. Jinn, T.S., Stone, J.M., Walker, J.C. (2000). **HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission.** *Genes Development*. 14:108-117.
66. Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., Graham C., Walker, G.C. (2007). **How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model.** *Nature Reviews in Microbiology*. 5:619-633.
67. Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. (2002). **Plant systematics: a phylogenetic approach.** *Sinauer Associates*. 287-292.
68. Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S., Rogers, J. (2005). **Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators.** *Science*. 308:1786-1789.

69. Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2006). **A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbioses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103:359-364.
70. Karimi, M., Inze, D., Depicker, A. (2002). **Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation.** *Trends in Plant Science*. 7:193-195.
71. Kevei, Z., Loughon, G., Mergaert, P., Horvath, G.V., Kereszt, A., Jayaraman, D., Zaman, N., Marcel, F., Regulski, K., Kiss, G.B. (2007). **3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*.** *Plant Cell*. 19:3974-3989.
72. Kim, S.Y., Sivaguru, M., Stacey, G. (2006). **Extracellular ATP in plants. Visualization, localization and analysis of physiological significance in growth and signaling.** *Plant Physiology*. 142:984-92.
73. Kinoshita, T., Caño-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J. (2005). **Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1.** *Nature*. 433:167-171.
74. Kirik, V., Simon, M., Huelskamp, M., Schiefelbein, J. (2004). **The ENHANCER OF TRY and CPC1 gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPRICE in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*.** *Development Biology*. 268:506-513.
75. Klaus-Heisen, D., Nurisso, A., Pietraszewska-Bogiel, A., Mbengue, M., Camut, S., Timmers, T., Pichereaux, C., Rossignol, M., Gadella, T.W., Imbert, A. (2011). **Structure–function similarities between a plant receptor-like kinase and the human interleukin-1 receptor-associated kinase-4.** *Journal of Biological Chemistry*. 286:11202-11210.
76. Kobe, B. y Deisenhofer, J. (1994). **The leucine-rich repeat a versatile binding motif.** *Trends in Biochemical Science*. 19:415-421.
77. Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., Duc, G., Kaneko, T., Tabata, S., de Bruijn, F. (2002). **Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase.** *Nature*. 420:422-426.

78. Lee, MM. y Schiefelbein, J. (1999). **WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning.** *Cell*. 99:473-483.
79. Lefebvre, B., Timmers, T., Mbengue, M., Moreau, S., Herve, C., Toth, K., Bittencourt-Silvestre, J., Klaus, D., Deslandes, L., Godiard, L. (2010). **A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:2343-2348.
80. Li, J. y Chory, J. (1997). **A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction.** *Cell*. 90:929-938.
81. Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T., Geurts, R. (2003). **LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod Factor-induced infection.** *Science*. 24:630-633.
82. Limpens, E., Mirabella, R., Fedorova, E., Franken, C., Franssen, H., Geurts, R. (2005). **Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by *DMI2*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102:10375-10380.
83. López-Lara, MI. (2000). **Microbios en línea.** Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno. UNAM.
84. Madsen, EB., Antolin-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., Krusell, L., Radutoiu, S., Jensen, ON., Stougaard, J. (2011). **Autophosphorylation is essential for the *in vivo* function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor1 and receptor-mediated signaling in cooperation with Nod factor receptor5.** *Plant Journal*. 65:404-417.
85. Madsen, EB., Madsen, LH., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwiska, M., Szczglowski, K., Sato, S., Nakamura, Y., Tabana, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2003). **A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals.** *Nature*. 425:637-640.
86. Madsen, L., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, JT., Heckmann, AB., Bek, AS., Ronson, CW., James, EK., Stougaard, J. (2010). **The molecular network governing nodule organogenesis and infection in model legume *Lotus japonicus*.** *Nature Communications*. 1-12.
87. Markmann, K., Giczey, G., Parniske, M. (2008). **Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria.** *PLoS Biology*. 6:497-506.

88. Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Morita, A., Sakagami, Y. (2002). **An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine.** *Science*. 296:1470-1472.
89. Messinese, E., Mun, JH., Yeun, LH., Jayaraman, D., Rouge, P., Barre, A., Loughon, G., Schornack, S., Bono, JJ., Cook, DR., Ane, JM. (2007). **A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20:912-921.
90. Middleton, PH., Jakab, J., Penmetsa, RV., Starker, CG., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, JF., Mitra, RM., Kereszt, A., Dudas, B., Bosch, 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.
91. Mitra, RM., Gleason, CA., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, JA., Oldroyd, GE., Long, SR. (2004). **A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:4701-4705.
92. Miyazawa, H., Oka-Kira, E., Sato, N., Takahashi, H., Wu, GJ., Sato, S., Hayashi, M., Betsuyaku, S., Nakazono, M., Tabata, S., Harada, K., Sawa, S., Fukuda, H., Kawaguchi, M. (2010). **The receptor-like kinase KLAVER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*.** *Development*. 137(24):4317-25.
93. 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.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:20996-1001.
94. Monshausen, GB., Messerli, MA., Gilroy, S. (2008). **Imaging of the yellowameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic Ca²⁺ follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*.** *Plant Physiology*. 147:1690-8.
95. Montoya, T., Nomura, T., Farrar, K., Kaneta, T., Yokota, T., Bishop, GJ. (2002). **Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling.** *Plant Cell*. 14:3163-3176.

96. Moon, J., Parry, G., Estelle, M. (2004). **The ubiquitin-proteasome pathway and plant development.** *Plant Cell*. 16:3181-3195.
97. Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore J., y Imberty A. (2006). **LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors.** *Glycobiology*. 16:801-809.
98. Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T. (1995). **Symbiotic Nitrogen Fixation.** *Plant Cell*. 7:869-885.
99. Nakagawa, T., Kaku, H., Shimoda, Y., Sugiyama, A., Shimamura, M., Takanashi, K., Yazaki, K., Aoki, T., Shibuya, N., Kouchi, H. (2011). **From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-*Rhizobium* symbiosis.** *Plant Journal*. 65:169-180.
100. Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, GJ., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M. (2002). **HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development.** *Nature*. 420:426-429.
101. Oldroyd, GE y Downie, JA. (2008). **Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes.** *Annual Review of Plant Biology*. 59:519-546.
102. Oldroyd, GE. y Downie, JA. (2004). **Calcium, kinases and nodulation signaling in legume.** *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*. 5:566-576.
103. Oldroyd, GE., Murray, JD., Poole, PS., Downie, JA. (2011). **The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis.** *Annual Review of Genetic*. 45:119-144.
104. Pawlowski, K. y Demchenko, KN. (2012). **The diversity of actinorhizal symbiosis.** *Protoplasma*. 249:1-13
105. Payne, CT., Zhang, F., Lloyd, AM. (2000). **GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1.** *Genetics*. 156:1349-1362.
106. Peiter, E., Sun, J., Heckmann, AB., Venkateshwaran, M., Riley, BK. (2007). **The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling.** *Plant Physiology*. 145:192-203.

107. Peters, NK. Frost, JW., Long, SR. (1986). **A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes.** *Science*. 233:977-980.
108. Popp, C. y Ott, T. (2011). **Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis.** *Current Opinion in Plant Biology*. 14:1-10.
109. Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., Stougaard, J. (2007). **LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range.** *EMBO Journal*. 26:3923–3935.
110. Radutoiu, S., Madsen, LH., Madsen, EB., Felle, HH., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabana, S., Sandal, N., Stougaard, J. (2003). **Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor like kinases.** *Nature*. 425:585-592.
111. Ramos, J. y Bisseling, T. (2003). **A method for isolation of root hairs from the model legume *Medicago truncatula*.** *Journal of Experimental Botany*. 54:2245-2250.
112. Riely, BK., Loughon, G., Ane, JM., Cook, DR. (2007). **The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots.** *Plant Journal*. 49:208-216.
113. Robatzek, S., Chinchilla, D., Boller, T. (2006). **Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*.** *Genes Development*. 20:537-542.
114. Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C. (1991). **Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals.** *Cell*. 67:1131-1143.
115. Roux, SJ. y Steinebrunner, I. (2007). **Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants.** *Trends Plant Science*. 12:522-7.
116. Russinova, E., Borst, JW., Kwaaitaal, M., Caño-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., de Vries, SC. (2004). **Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1).** *Plant Cell*. 16:3216-3229.

117. Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, JA., Parniske, M., Hayashi, M., Kawaguchi, M. (2007). **NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus***. *Plant Cell*. 19:610-624.
118. 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 and Environment*. 34:2109-2121.
119. Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., Stougaard, J. (1999). **A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules**. *Nature*. 402:191-195.
120. Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jurgens, G., Hulskamp, M. (2002). **TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis***. *EMBO Journal*. 21:5036-5046.
121. Schneider, A., Walker, SA., Poyser, S., Sagan, M., Ellis, TH., Downie, JA. (1999). **Genetic mapping and functional analysis of a nodulation-defective mutant (sym19) of pea (*Pisum sativum* L.)**. *Molecular and General Genetic*. 262:1-11.
122. Schultze, M., Kondorosi, A. (1998). **Regulation of simbiotic root nodule development**. *Annual Review of Genetic*. 32:33-57.
123. Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buire, M., Kondorosi, A. (1994). **Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions**. *International Review of Cytology*. 156:1-75.
124. Searle, IR., Men, AE., Laniya, TS., Buzas, DM., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, BJ., Gresshoff, PM. (2003). **Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase**. *Science*. 299:109-112.
125. Shiu, SH y Bleecker, AB. (2002). **Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis***. *Plant Physiology*. 132:530-543.

126. Smit, G., Swart, S., Ben, J., Lugtenberg, J., Kijne, JW. (1992). **Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots.** *Molecular Microbiology*. 6:2897-2903.
127. Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., Geurts, R. (2005). **NSP1 of the GRAS protein family is essential in rhizobial Nod factor-Induced transcription.** *Science*. 308:1789-1791.
128. Song, CJ., Steinebrunner, I., Wang, X., Stout, SC., Roux, SJ. (2006). **Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*.** *Plant Physiology*. 140:1222-32.
129. Song, WY., Wang, GL., Chen, LL., Kim, HS., Pi, LY., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, WX., Zhu, LH. (1995). **A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21.** *Science*. 270:1804-1806.
130. Spaink, H. (2002). **A receptor in symbiotic dialogue.** *Nature*. 417:910-911.
131. Stacey, G., Libault, M., Brechenmaher, L., Wan, J., D, G. (2006). **Genetics and functional genomics of legume nodulation.** *Current Opinion in Plant Biology*. 9:110-121.
132. Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulde,r L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., Parniske, M. (2002). **A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis.** *Nature*. 417:959-962.
133. Taiz, L y Zeiger, E. (2006). **Plant Physiology.** *Sinaver*. Pág. 289-313.
134. Tominaga, R., Iwata, M., Sano, R., Inoue, K., Okada, K., Wada, T. (2008). ***Arabidopsis* CAPRICE-LIKE MYB 3 (CPL3) controls endoreduplication and flowering development in addition to trichome and root hair formation.** *Development*. 135:1335-1345.
135. Torii, KU., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, RF., Komeda, Y. (1996). **The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats.** *Plant Cell*. 8:735-746.
136. Velia, A., Schwentesius, R., Almaguer, G. (2006). **La competitividad del frijol en México.** *Agricultura y mercado, El cotidiano*. Pág. 81-89.

137. Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y., Okada, K. (1997). **Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, CPC.** *Science*. 277:1113-1116.
138. Wais, R., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penrnetsa, R., Cook, D., Gough, C., Denarie, J., Long, S. (2000). **Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:13407-13412.
139. Walker, AR., Davison, PA., Bolognesi-Winfield, AC., James, CM., Srinivasan, N., Blundell, TL., Esch, JJ., Marks, MD., Gray, JC. (1999). **The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein.** *Plant Cell*. 11:1337-1350.
140. Wan, J., Torres, M., Ganapathy, A., Thelen, J., DaGue, BB., Mooney B., Xu, D., Stacey, G. (2005). **Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18:458-467.
141. Wang, L. (2009). **Towards revealing the structure of bacterial inclusion bodies.** *Prion*. 3:139-145.
142. Watson, L., y Dallwitz, MJ. (1992 onwards). **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval.** Version en línea 4 de Marzo 2011, <http://delta-intkey.com/angio/www/papilion.htm>
143. Wymer, CL., Bibikova, TN., Gilroy, S. (1997). **Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Journal*. 12:427-39.
144. Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, TL., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Parniske, M. (2008). **CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105:20540-20545.
145. Yoshida, S y Parniske, M. (2005). **Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation.** *Journal of Biological Chemistry*. 280:9203-9209.

146. Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, CT., Lloyd, A. (2003). **A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*.** *Development*. 130:4859-4869.
147. Zhao, DZ., Wang, GF., Speal, B., Ma, H. (2002). **The EXCESS MICROSPOROCTES1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther.** *Genes Development*. 16:2021-2031.
148. Zhu, H., Chen, T., Zhu, M., Fang, Q., Kang, H., Hong, Z., Zhang, Z. (2008). **A novel ARID DNA-binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule development in *Lotus japonicus*.** *Plant Physiology*. 148:337-347.