



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Silenciamiento de los genes tipo GNOM y su efecto en la nodulación de frijol
(*Phaseolus vulgaris*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Elizabeth Monroy Morales

TUTOR

Dra. Rosana Sánchez López
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Rosana Sánchez López
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Svetlana Shishkova
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Alicia Gamboa de Buen
[Instituto de Ecología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2017



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.

El presente proyecto de maestría en Ciencias Bioquímicas se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM), en el Departamento de Biología Molecular de Plantas, bajo la tutoría de la Dra. Rosana Sánchez López y con financiamiento parcial de proyectos DGAPA-PAPIIT IN203512, DGAPA-PAPIIT IN207215 y CONACyT CB-2010 00151193.

Reconocimiento y agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al apoyo para la realización del proyecto mediante beca de maestría de CONACyT

*A los hombres les encanta maravillarse.
Esto es la semilla de la ciencia*

Ralph Waldo Emerson (1803-1882)

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi cariño y amor a mis padres y hermanas, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mis padres, Juanita Morales y Luciano Monroy; especialmente a mi mamá por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. Gracias por estar siempre a mi lado, Mamá.

A mis hermanas Dalia y Laura, es maravilloso crecer al lado de alguien como ustedes. Con dedicatoria especial a una persona maravillosa, mi abuelita Cristina, sé que estarías orgullosa de verme concluir esta etapa de mi vida.

Agradezco el amor recibido, la dedicación y paciencia con la que cada día se preocupaban personas que ocupan un lugar muy especial en mi vida, por confiar en mí y estar ahí en los momentos más difíciles, motivándome a seguir y que siguen estando cerca de mí y que le regalan a mi vida algo de ellos.

Por todo esto, les agradezco de todo corazón por compartir momentos agradables. Los quiero mucho y nunca los olvidaré.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, doy gracias a Dios que además de su infinita bondad y amor, por permitirme tener tan agradable experiencia durante este proyecto de Investigación.

Gracias al Instituto de Biotecnología, IBT-UNAM, por convertirme en ser un profesional en lo que tanto me apasiona así mismo gracias a cada maestro que hizo parte de este proceso integral de formación. Mi agradecimiento con la Dra. Carmen Quinto, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora y guía de esta tesis, a la Dra. Rosana Sánchez López, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por apoyarme en todos los aspectos, por su enseñanza y motivación para seguir creciendo profesionalmente.

Agradezco a cada una de las personas que formaron parte del comité tutorial, la Dra. Svetlana Shishkova y la Dra. Alicia Gamboa de Buen, por las correcciones a esta tesis, sus aportaciones y comentarios. Quiero dar las gracias al Jurado de tesis, que revisó con paciencia este trabajo y culminó en la versión final del mismo, la Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz, Dra. Rosario Vera Estrella, Dr. Roberto Ruiz Medrano, Dra. Elizabeth Córdoba Martínez y el Dr. Enrique Salas Vidal.

Así mismo, quiero agradecer al personal técnico, compañeros y amigos del Laboratorio 19 del Departamento de Biología Molecular de Plantas, que participaron e hicieron posible este proyecto, muchas gracias por su apoyo y enseñanza. Entre ellos, a la Sra. Leo, agradezco su apoyo y motivación. Agradezco a mi compañero y gran amigo Raúl Dávila Delgado por el apoyo profesional y la ayuda con algunos experimentos.

Agradezco el apoyo técnico otorgado por la Unidad de servicios de microscopía, el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) del IBT-UNAM.

De igual forma, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el recurso presupuestal otorgado, para asistir al Congreso "Plant Biology" en Austin, Texas.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento, agradecimiento y gratitud.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia del modelo de estudio	1
1.1.1 La especie <i>Phaseolus vulgaris</i> , una planta leguminosa	2
1.2 Rizobia: bacterias fijadoras de nitrógeno	4
1.3 Diálogo molecular en la interacción simbiótica leguminosa-rizobia	5
1.3.1 Flavonoides: moléculas secretadas por la planta hospedera	5
1.3.2 Los factores Nod: moléculas bacterianas percibidas por la raíz de la leguminosa	6
1.3.3 Hilo de infección: pasaje de las bacterias hacia el primordio de nódulo	8
1.3.4 El nódulo: órgano fijador de nitrógeno	9
1.4 Pelos radicales: células epidérmicas de la raíz	11
1.4.1 ¿Por qué son un excelente modelo como sistema biológico?	11
1.5. La importancia de la ruta endo-exocítica en células eucariotas	12
1.5.1 Importancia del transporte vesicular	15
1.5.2 El papel de las GTPasas ARF/SAR1 en el transporte vesicular	17
1.6. Características de las proteínas de la familia ARF-GEF	19
1.7. Las proteínas ARF-GEF conocidas como GNOM, GNL1 y GNL2, específicas de plantas	21
1.8 Visualización del proceso de endocitosis mediante el uso de colorantes lipofílicos fluorescentes de la serie FM	24
1.9. Antecedentes	26
1.9.1 Acumulación de transcrito de los genes <i>PvGNOM</i> en diferentes secciones de la raíz de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa	26
2. JUSTIFICACIÓN	29

3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVO GENERAL	31
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5. METODOLOGÍA	32
5.1 Esterilización de las semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Negro Jamapa)	32
5.2 Germinación de semillas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa	32
5.3 Diseño de oligonucleótidos para amplificar los fragmentos RNAi (<i>PvGNOM1-i</i> , <i>PvGNOM2-i</i> y <i>PvGNOM3-i</i>)	33
5.4 Amplificación de los fragmentos <i>PvGNOM1-i</i> , <i>PvGNOM2-i</i> y <i>PvGNOM3-i</i>	33
5.5 Clonación de insertos en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®	34
5.6 Técnica de PCR en colonia	35
5.7 Recombinación en el vector destino pTdT-RNAi	36
5.8 Purificación del plásmido de las bacterias <i>E. coli</i> DH5α transformadas	38
5.9 Generación de raíces pilosas de <i>P. vulgaris</i> mediante el sistema de transformación con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599	38
5.10 Ensayos de RT-qPCR	39
5.11 Tinción histoquímica de GUS, escaneo digital y determinación del número y diámetro de los nódulos en raíces transgénicas	40
6. RESULTADOS	42
6.1 Diseño de oligonucleótidos gene-específicos-RNAi de los genes <i>GNOM1</i> , <i>GNOM2</i> y <i>GNOM3</i> en el genoma de <i>P. vulgaris</i>	42
6.2 Amplificación por PCR de los fragmentos RNAi (<i>PvGNOM1-i</i> , <i>PvGNOM2-i</i> y <i>PvGNOM3-i</i>)	43
6.3 Clonación de los fragmentos RNAi amplificados en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®	44
6.4 Recombinación de los fragmentos <i>PvGNOM1-i</i> y <i>PvGNOM2-i</i> en el vector destino pTdT-RNAi	46
6.5 Identificación de las clonas de <i>A. rhizogenes</i> K599 que portan las construcciones pTdT-RNAi- <i>PvGNOM1-i</i> o pTdT-RNAi- <i>PvGNOM2-i</i> y generación de raíces transgénicas en plantas de <i>P. vulgaris</i>	47
6.6 Determinación de la acumulación relativa de transcrito <i>PvGNOM1</i> y <i>PvGNOM2</i> en las raíces transgénicas	49
6.7 Análisis del fenotipo de las raíces transgénicas silenciadas en los genes <i>PvGNOM1</i> y <i>PvGNOM2</i>	52

6.7.1 Efecto del silenciamiento en el fenotipo de nodulación _____	52
6.7.2 Evaluación de la endocitosis en raíces de <i>P. vulgaris</i> tipo silvestre (3 dpg) mediante la internalización del marcador FM1-43 _____	57
6.7.3 Visualización del marcador FM1-43 en células corticales de las raíces transgénicas silenciadas _____	59
7. DISCUSIÓN _____	64
8. CONCLUSIONES _____	72
9. ANEXOS _____	74
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	82

ABREVIATURAS

ARF (*ADP Ribosylation Factor*): Factor de ribosilación del ADP, son proteínas de la familia de las GTPasas.

ARF-GEF (*ARF-Guanine nucleotide Exchange Factors*): Factor intercambiador de nucleótido de la GTPasa ARF.

BFA (acrónimo de *Brefeldin A*): Brefeldina A, metabolito fúngico que interfiere con el transporte vesicular.

CCaMK (acrónimo de *Calcium-and Calmodulin-dependent Kinase*): Proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina.

CCV (*Clathrin Coated Vesicle*): Vesícula cubierta de Clatrina.

CME (*Clathrin-Mediated Endocytosis*): Endocitosis mediada por Clatrina.

COP (acrónimo de *Coat Protein*): Subunidad del complejo “coatómero” de vesículas tipo COP.

cv: cultivar.

CYCLOPS: Activador transcripcional de unión a DNA.

dpg: días post germinación.

dpi: días post inoculación.

EE (*Early Endosome*): Endosoma temprano.

FBN: Fijación biológica de nitrógeno.

GDP (acrónimo de *Guanosine Diphosphate*): Guanosina-5'-difosfato.

GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*): Factor intercambiador de nucleótido de guanina.

GNOM: Proteína de la familia ARF-GEF.

GTP (*Guanosine triphosphate*): Guanosina-5'-trifosfato.

GTPasas: Guanosina Trifosfatasa.

hrs: horas.

IT (*Infection Thread*): Hilo de infección.

MP: Membrana Plasmática.

N₂: Dinitrógeno.

NF (*Nod Factor*): Factores Nod.

NH₄⁺: Amonio.

NIN (*Nodule Inception*): Factor transcripcional.

NO₃⁻: Nitrato.

NSP (*Nodulation Signaling Pathway*): Factor de transcripción.

PIN (*PIN-FORMED*): Transportador polar (eflujo) de auxinas.

RE: Retículo endoplásmico.

TGN (*trans-Golgi Network*): Red *trans*-Golgi.

RESUMEN

La interacción simbiótica leguminosa-rizobia conduce a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. El sitio de entrada de rizobia a la raíz es un pelo radical en crecimiento, con un dinámico movimiento de vesículas endocíticas y exocíticas en la zona apical. En seguida, se induce la formación de un hilo de infección transcelular, por donde las bacterias avanzan hacia el nódulo en formación. El nódulo se forma por la división de células del córtex en el sitio de infección. Al alcanzar la madurez, el tejido central del nódulo está compuesto por células no infectadas intercaladas entre células infectadas que contienen la forma bacteriodes de rizobia con la capacidad de fijar nitrógeno. Para analizar el papel del reciclaje endosomal durante la nodulación, en este trabajo se utilizó una estrategia de genética reversa (o silenciamiento por RNAi) para evaluar la participación de dos de los tres genes *PvGNOM* (*PvGNOM1* y *PvGNOM2*), en raíces transgénicas de *P. vulgaris* durante el desarrollo del nódulo. Para silenciar de manera gen-específico se clonaron los fragmentos *PvGNOM1-i* y *PvGNOM2-i* de aproximadamente 200 pb en el vector pTdT-RNAi. Por el método de transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* K599 que porta las construcciones correspondientes se generaron raíces transgénicas en *P. vulgaris*. Por RT-qPCR se confirmó una reducción del 50-60 % en el nivel de acumulación de transcrito *PvGNOM1* o *PvGNOM2* en las raíces transgénicas *PvGNOM1-i* y *PvGNOM2-i*, respectivamente, en comparación con las raíces transgénicas control, sin alterar los niveles de acumulación del transcrito de los otros genes *PvGNOM*. Las raíces transgénicas silenciadas tienden a generar más nódulos que en las raíces transgénicas control. El diámetro de los nódulos silenciados de 7 y 14 dpi es mayor que el de los nódulos control, pero al comparar la etapa de desarrollo en la que hay actividad de fijación de nitrógeno (14-21 dpi), el diámetro tiende a ser menor que el de los nódulos de raíces transgénicas control, lo que sugiere un retraso o inhibición de la madurez del nódulo. No se descarta que este efecto sea debido a una deficiencia en el proceso de infección y diferenciación a bacteroides en las células del tejido central del nódulo. Para analizar el efecto del

silenciamiento de *PvGNOM1* o *PvGNOM2* en la actividad de reciclaje endosomal, se evaluó la internalización del marcador fluorescente de endocitosis FM1-43 en las células del córtex externo de las raíces transgénicas. Se observó que el silenciamiento de *PvGNOM1* o *PvGNOM2* reduce la endocitosis y altera la distribución subcelular de FM1-43. En lugar del patrón punteado, intracelular, característico de la endocitosis de FM1-43, se observó una distribución de la fluorescencia en cúmulos que parecen compartimentos tipo BFA, similares a los observados en las raíces transgénicas control tratadas con BFA.

ABSTRACT

The legume-rhizobia symbiotic interaction leads to the formation of nitrogen-fixing nodules in the root. The entry of rhizobia into the root is through an actively growing root hair with a dynamic movement of endocytic and exocytic vesicles in the apical zone. Thereafter, the formation of a transcellular infection thread is induced in the root hair, which facilitates the movement of the bacteria towards the actively dividing cells at the infection site, leading to the nodule formation. When reaching maturity, the nodule central tissue is composed by few uninfected cells interspersed with infected cells containing differentiated form of rhizobia, the bacteroid with the ability to fix nitrogen. To gain insight into the role of the recycling endosome during the nodulation, in this study a reverse genetics strategy (RNAi mediated-silencing) was applied to address the participation of two out of the three *PvGNOM* genes (*PvGNOM1* y *PvGNOM2*) during the nodulation process in *P. vulgaris* transgenic roots. To express a gen-specific RNAi molecule, a 3'UTR fragment of approximately 200 pb was cloned into the pTdT-RNAi vector. By using the *Agrobacterium rhizogenes* K599-mediated transformation protocol, *P. vulgaris* transgenic roots bearing the corresponding constructs were generated. A 50-60 % reduction in the transcript accumulation of *PvGNOM1* or *PvGNOM2*, respectively, was confirmed in the *PvGNOM1-i* or *PvGNOM2-i* transgenic roots, respectively, by RT-qPCR assessment. Transcript level of the other *PvGNOM* genes was not affected. Silenced transgenic roots tend to generate more nodules than control transgenic roots. The diameter of the silenced nodules at 7 and 14 dpi was larger than in the control nodules; however, when comparing the developmental stage when the nitrogen-fixing activity is present in the nodule (14-21 dpi), the nodule diameter was smaller than that of nodules in control transgenic roots, suggesting a delay in or an inhibition of the nodule maturation. The possibility that such effect is due to an impairment of the cell infection or the bacterial differentiation to bacteroid processes in the nodule.

To explore the effect of the *PvGNOM1* o *PvGNOM2* silencing on the activity of the recycling endosome, the internalization of the fluorescent marker of endocytosis, FM1-43, was addressed in the cells of the external cortex in the transgenic roots. A reduction of the FM1-43 endocytosis was observed in the *PvGNOM1*- o *PvGNOM2*- silenced transgenic roots. Differences in the subcellular distribution of FM1-43 were also detected. Instead of the intracellular punctated pattern, characteristic of the FM1-43 endocytosis, fluorescence was distributed in cumuli that resemble the BFA-compartments. A similar pattern was observed when control transgenic roots were treated with BFA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del modelo de estudio

El nitrógeno es un elemento esencial para el desarrollo de los seres vivos, forma parte de moléculas fundamentales: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas. En la atmósfera, el nitrógeno se encuentra en forma diatómica (N_2) pero, si bien representa alrededor del 78 % de la composición del aire, no es asimilable por la mayoría de los seres vivos, incluyendo las plantas. En el suelo, el nitrógeno se encuentra como nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), ambos asimilables por las plantas pero poco abundantes por lo que, en buena medida, la agricultura depende de la fertilización química del suelo. La fijación biológica de nitrógeno (FBN), una parte esencial del ciclo del nitrógeno, es el proceso por el cual el nitrógeno atmosférico es convertido a amonio (NH_4^+) (Brewin, 2010; Wang *et al.*, 2012).

Los organismos que pueden convertir (fijar) el N_2 en moléculas nitrogenadas asimilables son pocos y son denominados diazótrofos, los cuales pueden ser encontrados en vida libre (bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*, entre otros) o en asociaciones simbióticas que se caracterizan por que conducen al desarrollo de un nuevo órgano en la raíz, el nódulo fijador de nitrógeno. Tal es el caso de las bacterias filamentosas del género *Frankia*, que hacen simbiosis con plantas actinorrícicas y, de particular interés en este trabajo, las bacterias rizobia (familia Rhizobiaceae) que establecen una relación simbiótica con las leguminosas (Masson-Boivin *et al.*, 2009; Olivares *et al.*, 2013). A cambio de las formas de nitrógeno asimilable que la planta recibe de las bacterias, éstas se benefician con azúcares que le proporciona la planta (Sulieman y Tran, 2014).

El estudio de la biología celular y molecular de la relación simbiótica leguminosa-rizobia, es el tema central del grupo de investigación donde se realiza este proyecto de tesis. La leguminosa utilizada como modelo es *Phaseolus vulgaris* o frijol común y sus endosimbiontes *Rhizobium etli* y *R. tropici*.

1.1.1 La especie *Phaseolus vulgaris*, una planta leguminosa

Las leguminosas son de gran importancia para la alimentación mundial y la regeneración del suelo. Sus semillas son una fuente esencial de nutrientes tanto para consumo humano como de animales (Hayat *et al.*, 2014). El fruto de las leguminosas, es una legumbre o vaina simple, alargada, comprimida y cuyas semillas se encuentran organizadas en una hilera ventral, característica que da nombre a las leguminosas (Figura 1A y 1B). De acuerdo a Hayat y cols. (2014), las semillas de leguminosas son ricas en carbohidratos (50-60 %), en proteínas (21-24 %) enriquecidas en aminoácidos como lisina, fenilalanina y tirosina, y en lípidos normalmente de 1-6 % (Reyes *et al.*, 2008; Gepts, 2001; Bitocchi *et al.*, 2012).

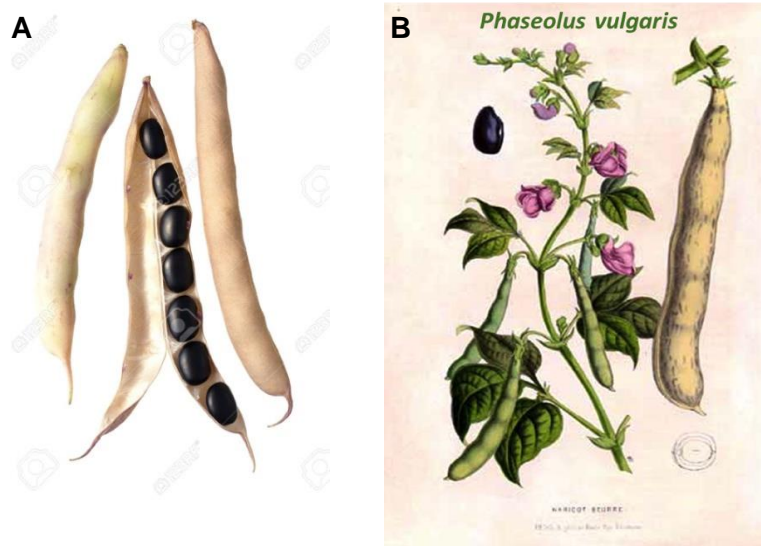


Figura 1. **A**, Imagen de legumbre o vaina, fruto característico en las plantas de la familia de las Leguminosas. **B**, Partes de la leguminosa *P. vulgaris*: semilla, hojas, flores y la vaina donde se almacenan las semillas. Imagen obtenida de la liga <http://www.memrise.com/course/280935/plants-latineng-picnt/4/>.

La clasificación taxonómica indica que las leguminosas pertenecen al reino Plantae, división Magnoliophyta (plantas con flor), orden Fabales, familia

Fabaceae o Leguminosae; son la tercera familia de plantas con flores más numerosa después de la familia Asteraceae y Orchidaceae. La familia Leguminosae está dividida en tres subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinoideae y Papilionoideae, que en su conjunto comprenden más de 650 géneros y alrededor de 18,000 especies agrupadas en 40 tribus (Zhu *et al.*, 2005). La subfamilia Papilionoideae incluye géneros como *Pisum*, *Glycine*, *Medicago*, *Vicia*, *Phaseolus*, entre otros.

P. vulgaris, es la especie más conocida del género *Phaseolus*. El nombre científico *Phaseolus vulgaris* L. fue asignado por el botánico sueco Carlos Linneo, en 1753 en su trabajo "Species Plantarum". De acuerdo a Gepts (2001), el género *Phaseolus* tiene más de cincuenta especies, cinco de las cuales son domesticadas: *Phaseolus lunatus* L. 1753 (frijol lima), *Phaseolus coccineus* L. 1753 (frijol ayocote), *Phaseolus acutifolius* A. 1852 (frijol tepari) y *P. vulgaris* L. 1753 (frijol común).

Según evidencias arqueológicas, cronológicas y botánicas, el origen y domesticación de *P. vulgaris* se ubican en América. De acuerdo a Bitocchi y cols. (2012), los sitios de domesticación del frijol son el valle de Oaxaca, en Mesoamérica, y el sur de Bolivia y norte de Argentina, en América del Sur, y tiene una amplia distribución desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina (Gepts, 2001; Reyes *et al.*, 2008; Bitocchi *et al.*, 2012). La alta variabilidad de especies de frijol encontradas en Mesoamérica, comparada con la población genética andina, sugiere que Mesoamérica es la cuna de domesticación del frijol común, al igual que otros cultivos importantes como *Zea mays* (maíz) y *Cucurbita spp* (calabaza), (Bitocchi *et al.*, 2012).

Hoy en día, *P. vulgaris* es de gran importancia agrícola a nivel mundial, siendo India uno de los países productores de leguminosas con un 18.49 % de la producción mundial, Brasil con 16.55 %, China con 11.47 %, Estados Unidos con 6.84 % y México, en quinto lugar, con un 6.80 %. México se encuentra entre los países con mayor consumo de frijol en el mundo (Reyes *et al.*, 2008).

1.2 Rizobia: bacterias fijadoras de nitrógeno

Las bacterias fijadoras de nitrógeno, pertenecientes a la familia Rhizobiaceae, están distribuidas en diversos géneros como *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Rhizobium* (Lindström y Mousavi, 2010). Son bacterias del suelo, gram-negativas, con forma de bacilos; en vida libre, las bacterias del género *Rhizobium* tienen un diámetro de 0.5-0.9 μm y una longitud de 1.2-3.0 μm ; su movilidad es debida a la existencia de un flagelo polar (monotrico) o de múltiples flagelos que se proyectan en todas direcciones (peritricos). En el nódulo fijador de nitrógeno, los rizobia se diferencian a bacteroides y pueden llegar a tener un tamaño mayor al de la bacteria, con una longitud de 5 a 10 μm y son inmóviles (Kereszt *et al*, 2011).

Los rizobia puede encontrarse en un rango de densidad poblacional en la rizósfera, usualmente alrededor de 10^2 a 10^5 bacterias por gramo de suelo (Downie, 2007). Los exudados de las plantas a la rizósfera proporcionan una fuente rica en energía y nutrientes para la bacteria, lo que genera mayores poblaciones bacterianas (Lindström y Mousavi, 2010). La baja concentración de nitrógeno en el suelo, favorece el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobia y el desarrollo del nódulo fijador de nitrógeno. El análisis de los rizobia aislados de los nódulos fijadores de nitrógeno desarrollados en diferentes leguminosas indica que, de manera general, es una relación simbiótica especie-específica, tanto en términos de la bacteria como de la planta hospedera, de donde, a cada especie de leguminosa le corresponde una especie de rizobia compatible (Brewin, 2010; Ferguson *et al.*, 2010; Lindström y Mousavi, 2010; Wang *et al.*, 2012), aunque una planta puede asociarse con más de una especie de rizobia. Por ejemplo, *Bradyrhizobium japonicum* sólo infecta raíces de soya (*Glycine max*), mientras que *R. etli* y *R. tropici* infectan raíces de *P. vulgaris*. Las leguminosas modelo de los géneros *Medicago* (*M. sativa* y *M. truncatula*) y *Lotus* (*L. japonicus*) establecen simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium*

loti, respectivamente, por citar algunos ejemplos (Downie, 2007; Wang *et al.*, 2012).

1.3 Diálogo molecular en la interacción simbiótica leguminosa-rizobia

1.3.1 Flavonoides: moléculas secretadas por la planta hospedera

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, producidos por las plantas y exudados por la raíz hacia la rizósfera, cuya composición depende de la especie vegetal de la que se trate. Son compuestos de 15 carbonos que contienen dos anillos aromáticos llamados A y B, ligados a través de un anillo heterocíclico C. Los flavonoides forman un grupo de aproximadamente nueve mil metabolitos secundarios, se dividen en subgrupos que incluyen chalconas, flavonas, isoflavonoles, flavanonas, antocianinas, entre otros (Miranda *et al.*, 2012).

El tipo de flavonoides exudado por una especie de leguminosa es específico para activar los genes de nodulación de una especie determinada de rizobia. Por ejemplo, el flavonoide genisteína, exudado por *P. vulgaris* es reconocido por *R. etli* y *R. tropici* (Downie, 2007). Los flavonoides son percibidos por el activador transcripcional NodD, presente en la membrana bacteriana, lo que induce la expresión de genes de nodulación (genes “*nod*”), responsables de la síntesis y secreción de los factores Nod (NF, “Nod Factor”), una familia de lipoquitooligosacáridos esenciales para el inicio de la simbiosis (Wang *et al.*, 2012; Haag *et al.*, 2013).

1.3.2 Los factores Nod: moléculas bacterianas percibidas por la raíz de la leguminosa

La estructura básica de los factores Nod, es muy conservada y consiste de un esqueleto de residuos de *N*-acetilglucosamina, unidos por enlaces β 1-4; la posición 2 del carbono del residuo del extremo terminal no reducido presenta un enlace con un ácido graso (grupo acilo, Figura 2). Dependiendo de la especie de rizobia, el largo de la cadena y el grado de insaturación del ácido graso varía; es frecuente encontrar otras sustituciones en el extremo reductor, como grupos metilo, sulfato y carbamoilo, entre otros (Folch-Mallol *et al.*, 1996).

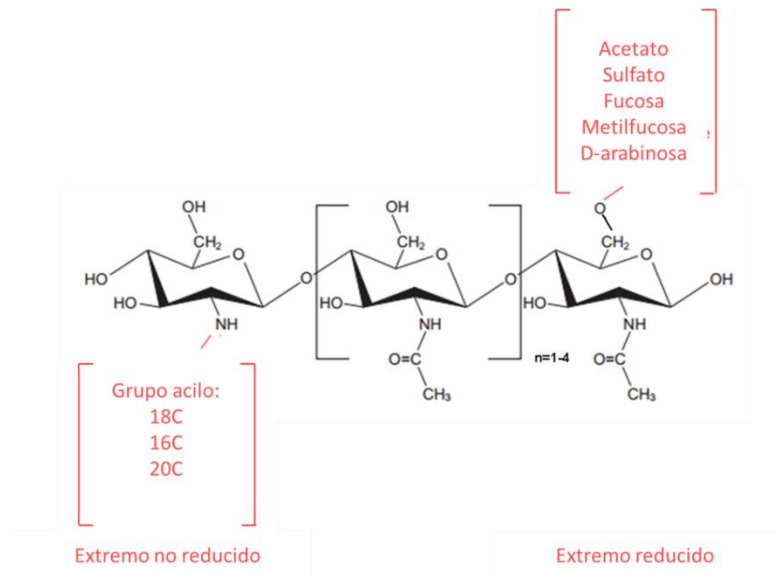


Figura 2. Estructura general de los factores Nod: esqueleto de *N*-acetilglucosamina (negro) con sustituciones en el extremo reductor y una cadena de ácido graso en el extremo no reductor (rosa). Modificado de Long, 1996.

R. etli produce NF con grupos acetilo-fucosilados, metilo y carbamoilo (Poupot *et al.*, 1995; Morón *et al.*, 2005). La estructura de los NF es uno de los principales determinantes en la relación hospedero-simbionte, su especificidad es atribuida a las diferentes sustituciones de los NF en el quitooligosacárido (Oldroyd, 2007).

La percepción de los factores Nod es a través de receptores específicos localizados en la membrana plasmática (MP) del pelo radical, son receptores tipo cinasa serina/treonina con dominios LysM en su extremo extracelular (Wang *et al.*, 2012). En *L. japonicus* se han encontrado dos receptores de NF (“Nod Factor Receptor”): NFR1 y NFR5, cuyos ortólogos en *M. truncatula* son NFP (“Nod Factor Perception”) y LYK3 (“LysM receptor-like kinases”), respectivamente (Oldroyd y Downie, 2008). Cuando los factores Nod se unen a su receptor, se desencadena una serie de respuestas que conducen a la activación de una cascada de transducción de señales en el ápice del pelo radical, como son deformación y enroscamiento, oscilaciones de calcio, rearrreglo del citoesqueleto de actina y la transcripción de genes involucrados en la organogénesis del nódulo, entre otros (Du Toit, 2014).

Las oscilaciones de calcio son decodificadas por una cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK), lo que induce la expresión de genes involucrados en la simbiosis y formación de nódulo (Du Toit, 2014). CCaMK interactúa y fosforila a CYCLOPS, lo que favorece que CYCLOPS se una al promotor del gen *NIN* (“Nodule Inception”) e induce su expresión. Además de participar en la cascada de transducción de señales, CYCLOPS tiene un papel importante en la organogénesis del nódulo (Singh *et al.*, 2014). CCaMK también activa la fosforilación de factores de transcripción como NSP1 y NSP2 (“Nodulation Signaling Pathway” 1 y 2), los cuales inducen la expresión de varios genes denominados nodulinas tempranas (*ENOD*, “Early Nodulin”), requeridos para la deformación del pelo radical y la formación del primordio de nódulo (Jones *et al.*, 2007).

La deformación, curvatura y enroscamiento del ápice del pelo radical en respuesta a los factores Nod (Figura 3), sólo sucede en un pelo radical en crecimiento (Ovečka *et al.*, 2005). Estos cambios son esenciales para que la bacteria quede atrapada en un pliegue del ápice enroscado y se forme una microcolonia. A este sitio se le conoce como cámara de infección. La siguiente etapa implica la invaginación de la pared celular y de la membrana plasmática que rodea la

cámara de infección para formar una nueva estructura, llamada hilo de infección (ver inciso 1.3.3).

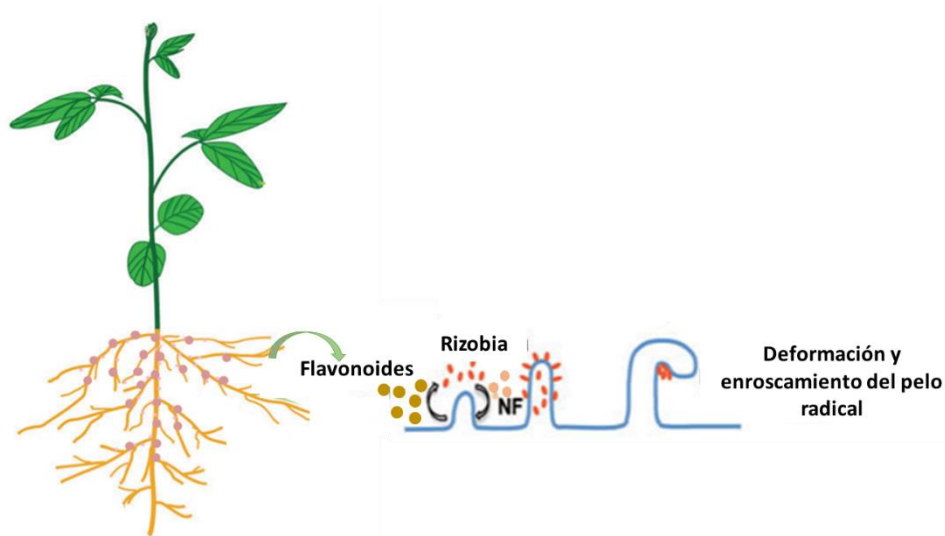


Figura 3. Diálogo molecular que da inicio a la simbiosis. Los flavonoides liberados por la leguminosa son percibidos por los rizobia, desencadenando la transcripción de los genes “*nod*” para la síntesis y secreción de los NF. El pelo radical responde a la percepción de los NF bacterianos induciendo la deformación y encorvamiento del ápice del pelo radical. Los rizobia quedan atrapados en el pliegue y forman una microcolonia. Modificado de Ferguson *et al.*, 2010.

La percepción de los NF también induce la desdiferenciación y división de las células del córtex en el sitio de infección, para generar una zona meristemática que forma un primordio de nódulo, el cual aumenta en tamaño y emerge de la raíz (ver Figura 4; Ferguson *et al.*, 2010; Popp y Ott, 2011).

1.3.3 Hilo de infección: pasaje de las bacterias hacia el primordio de nódulo

El hilo de infección (IT, por las siglas en inglés de “*I*nfection *I*hread”), es una estructura tubular, transcelular, tipo túnel, que se elonga hacia la zona basal del pelo radical e invade las células del primordio del nódulo (Figura 4). La matriz del hilo de infección es un entorno extracelular que favorece la proliferación y

desplazamiento de rizobia (Oldroyd, 2007; Oldroyd *et al*, 2011). La formación y elongación del hilo de infección involucra una constante síntesis y secreción de componentes de la pared celular así como la continua formación de la MP (Ovečka *et al.*, 2005), es decir, requiere de la deposición de nuevas proteínas, lípidos y polisacáridos a través de procesos de exocitosis-endocitosis (Gage, 2004; Oldroyd *et al.*, 2011).

El hilo de infección se elonga, ramifica y avanza hacia el primordio del nódulo, donde las bacterias son “vertidas” al interior de las células del primordio en una nueva estructura endomembranosa, tipo organelo, denominada simbiosoma. En la matriz del simbiosoma, la bacteria se diferencia a bacteroide y adquiere la capacidad de fijar nitrógeno, vía el complejo nitrogenasa (King y Weber, 2007).

1.3.4 El nódulo: órgano fijador de nitrógeno

El nódulo es un órgano formado *de novo* en la raíz de la leguminosa, presenta una organización celular caracterizada por un córtex externo, un córtex interno y la zona de infección (tejido central). Los nódulos pueden ser indeterminados o determinados (Ferguson *et al.*, 2010). Los nódulos indeterminados se originan por la división de células del periciclo y del córtex interno de la raíz, tienen un meristemo activo (persistente) en la zona apical, lo que resulta en un nódulo de forma ovalada, y están representados por los nódulos desarrollados en *M. sativa* (alfalfa), *Trifolium repens* (trébol) y *Pisum sativum* (chícharo), entre otros. Mientras que el nódulo determinado tiene su origen en la división de las células del córtex externo, presenta una forma esférica, carece de un meristemo persistente y se origina por la división de células del córtex externo de la raíz, por ejemplo, los nódulos desarrollados en *G. max*, *L. japonicus* y *P. vulgaris*.

La organización de tejidos en el nódulo determinado da inicio cuando las células de la periferia del primordio del nódulo se diferencian formando el córtex interno y externo del nódulo (Figura 4). El córtex interno delimita la zona del tejido central

donde inicia la infección intracelular y se forma el tejido pro-vascular en la base del nódulo joven. Aproximadamente a los 14 días post-inoculación (dpi), los haces vasculares, incluidos en el córtex interno, rodean el tejido central y se observa diferenciación de bacterias a bacteroides, que expresan el complejo enzimático nitrogenasa, de donde, se detecta actividad de fijación de nitrógeno en el nódulo. Esta actividad es muy sensible, se inactiva en presencia de oxígeno. La proteína de nódulo leghemoglobina, con gran afinidad por el oxígeno, y responsable de mantener el entorno con baja tensión de oxígeno, se localiza en el citosol de las células infectadas con bacteroides y confiere el típico color rosáceo en los nódulos fijadores de nitrógeno (King y Weber, 2007). El nódulo determinado alcanza su madurez cuando la mayoría de las células del tejido central están infectadas con bacteroides y se observa la máxima actividad de fijación de nitrógeno del nódulo (Ferguson *et al.*, 2010; Oldroyd *et al.*, 2011; Popp y Ott, 2011). El nódulo de *P. vulgaris* es maduro a los 21 dpi.

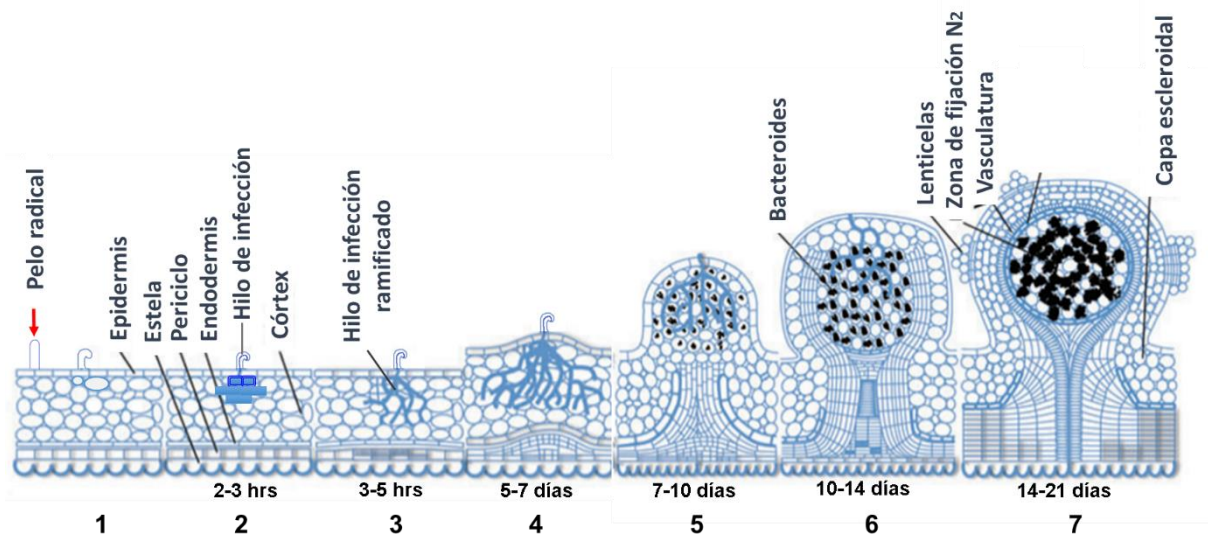


Figura 4. Etapas de la organogénesis de un nódulo determinado. **1**, Percepción de factores Nod, deformación y encorvamiento del pelo radical. **2**, Formación del hilo de infección y división anticlinal de las células adyacentes al sitio de infección. **3**, Ramificación y avance del hilo de infección hacia las células del nódulo en formación. **4**, El primordio de nódulo emerge de la raíz. **5**, Inicio de organización de tejidos en nódulo joven. **6**, Nódulo infectado con bacteroides, con actividad de nitrogenasa. **7**, Nódulo maduro con máxima actividad de fijación de nitrógeno. Modificado de Ferguson *et al.*, 2010.

1.4 Pelos radicales: células epidérmicas de la raíz

1.4.1 ¿Por qué son un excelente modelo como sistema biológico?

Los pelos radicales son extensiones de células epidérmicas de la raíz y tienen forma cilíndrica, son importantes para la adquisición de nutrientes y agua, así como en la respuesta a estímulos, la interacción con microorganismos, el anclaje de la raíz y el sitio principal de entrada de rizobia a la raíz de las leguminosas (Dubrovsky y Shishkova, 2007; Libault *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2015).

Los pelos radicales, al igual que los tubos polínicos, son células tubulares que presentan un crecimiento apical (“tip-growth”) polarizado, que se ve favorecido por un bajo entrecruzamiento de los componentes de la pared celular, así como por la síntesis *de novo* y deposición de componentes de pared celular en la zona apical (Emons y Ketelaar, 2009). En la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, los pelos radicales tienen un diámetro aproximado de 10 μm y pueden crecer 1 mm o más en longitud (Figura 5), con una tasa de crecimiento de hasta 1 μm /minuto (Velasquez *et al.*, 2015).

Estudios de microscopía *in vivo* de la zona apical del pelo radical muestran que el crecimiento de esta célula es un proceso altamente coordinado, que involucra al citoesqueleto y a un gran número de vesículas en activo movimiento asociado al flujo citoplásmico tipo fontana invertida (“reverse fountain-like streaming”), es decir, se presenta un desplazamiento de citoplasma por la parte media del pelo radical hacia la zona apical para luego revertir el flujo por la parte cortical de la célula (Ovečka *et al.*, 2005). La inhibición de la polimerización de actina afecta la elongación de los pelos radicales, al igual que en los tubos polínicos (Sieberer *et al.*, 2005).

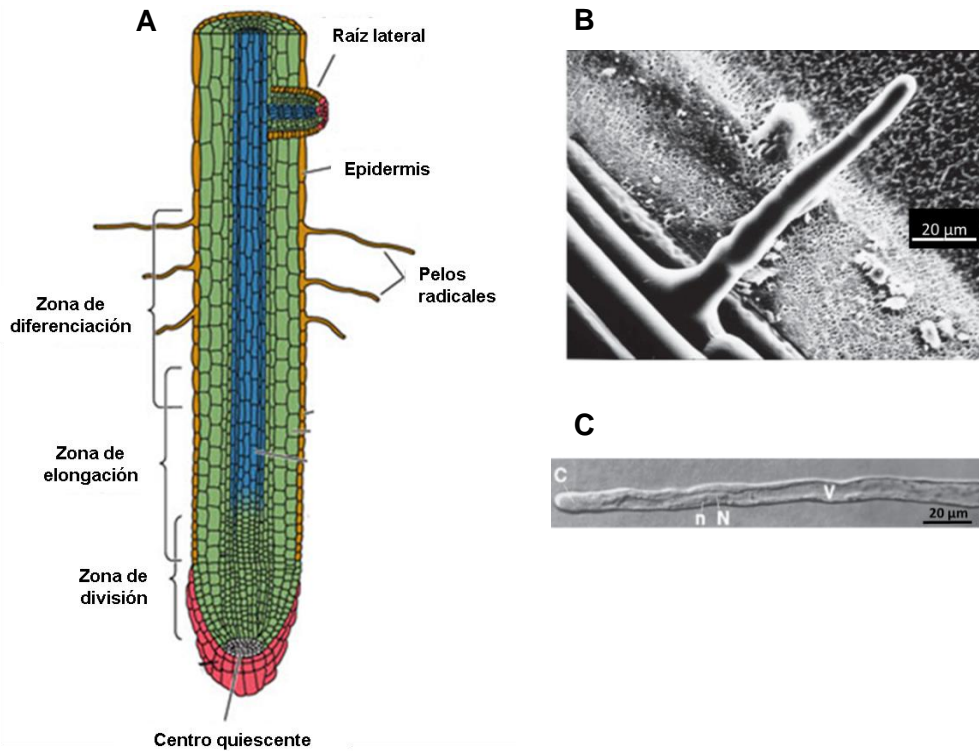


Figura 5. **A**, Esquema de la arquitectura de la raíz de la planta modelo *A. thaliana*. Se indican las diferentes zonas de la raíz, en la zona de diferenciación se originan los pelos radicales. Imagen obtenida de: http://bcs.whfreeman.com/thelifewire8e/content/cat_010/f34014.jpg. **B**, Micrografía electrónica de barrido y **C**, microscopía óptica de contraste de fases de un pelo radical de *A. thaliana*. Imágenes tomadas de Grierson *et al.*, 2014. V, vacuola; C, citoplasma; N, núcleo; n, nucléolo.

1.5. La importancia de la ruta endo-exocítica en células eucariotas

La endocitosis y exocitosis son mecanismos celulares propios de las células eucariotas, juegan un papel importante en la localización subcelular de proteínas, transducción de señales, reciclaje de componentes y adquisición de nutrientes, entre otros. En buena medida, las rutas de endocitosis y exocitosis son procesos de transporte vesicular y fusión de membranas.

Las células eucariotas utilizan un sistema endomembranoso complejo para sintetizar, eliminar, recambiar o reciclar proteínas, lípidos y polisacáridos de la superficie celular, del núcleo, de otros compartimentos celulares y del espacio

extracelular. El sistema endomembranoso de las rutas exocítica/endocítica incluye retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, endosomas, lisosomas/vacuolas, envoltura nuclear y MP. El flujo endocítico (entrada), mejor conocido como endocitosis, comparte con el flujo exocítico (salida) algunos procesos y compartimentos celulares, de donde, *sensu stricto*, la endocitosis y exocitosis no son independientes. No obstante, por razones didácticas suelen describirse como mecanismos independientes.

A lo largo de la vía exocítica, la célula sintetiza *de novo* proteínas, lípidos, oligo- y polisacáridos, o moléculas compuestas como glicoproteínas y lipoproteínas, cuyo destino es la MP u organelos de la ruta exocítica/endocítica. De manera simple, la ruta exocítica inicia con la síntesis *de novo* de proteínas y lípidos en el RE, los cuales son transportados (moléculas cargo), vía vesículas tipo COPII (acrónimo de “Coat Protein Complex II”) al *cis*-Golgi, para seguir su ruta entre las cisternas del Golgi hacia el TGN (por siglas en inglés de “trans-Golgi Network”) o ser recicladas al RE, esto mediado por vesículas tipo COPI. En las células vegetales, las pectinas se ensamblan en Golgi, mientras que los precursores de celulosa se sintetizan en el Golgi, pero la celulosa es ensamblada en la MP. Dependiendo de su destino, del TGN las moléculas cargo son enviadas a la MP vía vesículas tipo CCV (por sus siglas en inglés de “Clathrin Coated Vesicle”), a los lisosomas o a los endosomas. La Figura 6 recapitula las etapas de la ruta exocítica y el tipo de vesículas involucradas.

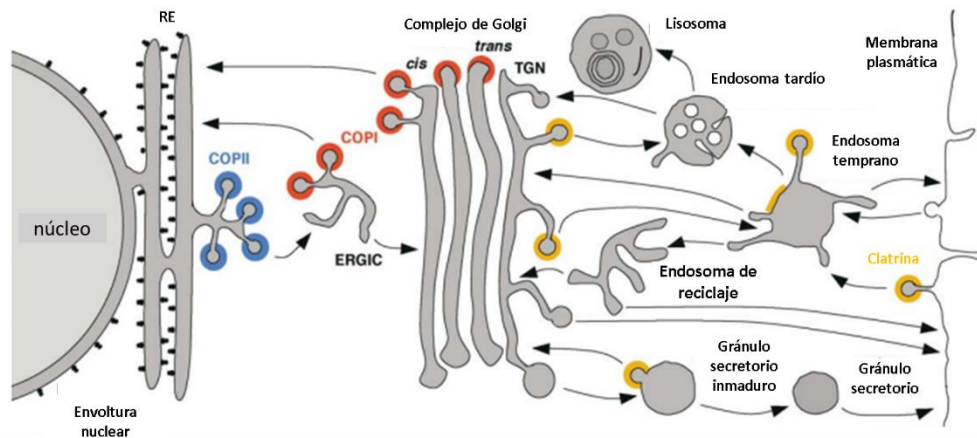


Figura 6. Vía del transporte vesicular en células eucariotas. Se resaltan los tipos de vesículas que participan en el transporte vesicular y su distribución subcelular: COP II (azul), COPI (rojo) y CCV (amarillo). Imagen tomada de Bonifacino y Glick, 2004.

La vía endocítica o endocitosis es el conjunto de procesos a través de los cuales las células eucariotas internalizan material extracelular y componentes de la MP (moléculas cargo). Entre las funciones de la endocitosis están la adquisición de nutrientes, la respuesta a estímulos, la transducción de señales, etcétera. De la variedad de mecanismos endocíticos (fagocitosis, pinocitosis, macropinocitosis, entre otros), el proceso mejor caracterizado es la endocitosis mediada por clatrina o CME (por siglas en inglés de “Clatrin-Mediated Endocitosis”). Una vez endocitada, la CCV pierde su cubierta de clatrina y se fusiona al endosoma, organelo donde se define el destino del material endocitado, pudiendo ser el TGN, el lisosoma/vacuola o a la MP a partir de endosoma de reciclaje (Alberts *et al.*, 2008). Estas etapas también son mediadas por CCV. Este mecanismo está muy conservado en eucariotes, no obstante, según Šamaj y cols. (2006), las CCV en plantas son más pequeñas (70-90 nm) que en animales (120 nm). Es de mencionar que en el endosoma, no sólo convergen las vesículas endocíticas, sino también las CCV que provienen del complejo TGN y del lisosoma/vacuola (Bonifacino y Glick, 2004).

Si bien, la maquinaria de exocitosis/endocitosis está muy conservada en eucariotes, en plantas presenta algunas peculiaridades. Por ejemplo, el RE es muy abundante en la zona cortical de la célula vegetal, el Golgi está compuesto por cientos de pequeñas cisternas Golgi, móviles (Bassham *et al.*, 2008), el TGN y el EE (por siglas en inglés de “Early Endosome”) forman un solo compartimento, un organelo híbrido denominado TGN/EE, con actividad de segregación (“sorting”). El TGN/EE es el sitio destino de la vesícula endocítica y de segregación de componentes que deben incorporarse a la MP, a través de la vía de reciclaje (endosomas de reciclaje) y de exocitosis, o a las vacuolas, para su degradación (Uemura, 2016).

1.5.1 Importancia del transporte vesicular

El tráfico vesicular, también referido como transporte vesicular y fusión de membranas, es un proceso muy conservado en eucariotes; no es un mecanismo de síntesis, su papel es mantener la homeostasis celular de proteínas, lípidos y algunos carbohidratos. Es un mecanismo de transporte de componentes entre compartimentos endomembranales, es decir, entre un compartimento (membrana) donador y otro aceptor (Alberts *et al.*, 2008).

El transporte vesicular involucra varias etapas que se suceden en estricto orden (Figura 7): 1) iniciación, en el que se reclutan las moléculas a transportar, en seguida, los componentes de la maquinaria de la biogénesis de la vesícula, entre los que se encuentran las proteínas SNARE, las GTPasas pequeñas Rab y ARF/SAR1, y su intercambiador GDP/GTP (GEF, por siglas en inglés de “Guanine nucleotide Exchange Factor”), y las diferentes subunidades estructurales que formarán la cubierta de la vesícula (las cadenas ligera y pesada de clatrina, en CCV; las subunidades COP α , β , δ , γ , ϵ y ζ , en COPI y Sec13, Sec16, Sec23, Sec24 y Sec31, en COPII). 2) Gemación de la vesícula, como resultado de la interacción entre las subunidades estructurales y el ensamblaje de la cubierta para

formar una estructura esférica, muy estable, que recubre la vesícula. 3) Escisión de la vesícula cubierta. 4) Desensamblado de la cubierta de la vesícula. 5) Anclaje de la vesícula, por interacción entre algunas proteínas de la membrana donadora (vSNARE y Rab) y aceptora (Factor de anclaje). 6) Acoplamiento de la vesícula, vía entrelazado de las alfa-hélices de proteínas vSNARE (vesícula) y tSNARE (membrana aceptora). 7) Fusión de membranas (Bonifacino y Glick, 2004; Cai *et al.*, 2007; Angers y Merz, 2010).

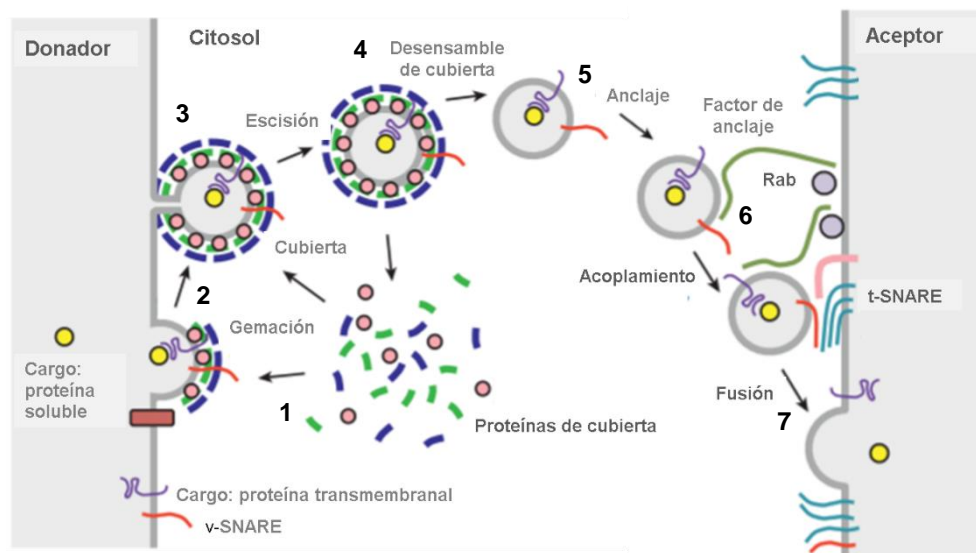


Figura 7. Esquemización de las etapas del transporte vesicular. **1,** Iniciación: reclutamiento de moléculas a transportar (cargo) y de componentes de la maquinaria de la biogénesis de la vesícula. **2,** Gemación. **3,** Escisión de la vesícula. **4,** Desensamblaje de la cubierta de la vesícula. **5,** Anclaje de la vesícula por interacción entre componentes de las membranas donadora y aceptora. **6,** Acoplamiento vía proteínas vSNARE. **7,** Fusión de membranas. Modificado de Bonifacino y Glick, 2004.

Los mecanismos y genes involucrados en la formación de estas vesículas están muy conservados en eucariotes. Si bien la biogénesis de las vesículas en plantas está poco caracterizada, la identificación de estos genes en los genomas de *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* y de otras plantas, incluyendo *P. vulgaris* (tesis de Licenciatura de Elizabeth Monroy Morales, 2013) refuerza la noción de que en

células vegetales el transporte vesicular también está mediado por vesículas COPI, COPII y CCV (Holstein, 2002; Chen *et al.*, 2011).

1.5.2 El papel de las GTPasas ARF/SAR1 en el transporte vesicular

Las GTPasas forman una superfamilia de enzimas que unen e hidrolizan GTP, cuya estructura oscila entre un estado activo (unido a GTP) y uno inactivo por unión a GDP (Figura 8A). La actividad de las GTPasas está regulada por dos proteínas accesorias: la GEF, que disocia el GDP de la GTPasa y favorece la unión a GTP (abundante en el citosol), y la GAP (por siglas en inglés de GTPase-activating protein), que estimula la actividad hidrolasa de la GTPasa (Scheffzek y Ahmadian, 2005). De manera general, a cada GTPasa le corresponde una GEF y una GAP específicas, lo que implica que hay una variedad de estas proteínas.

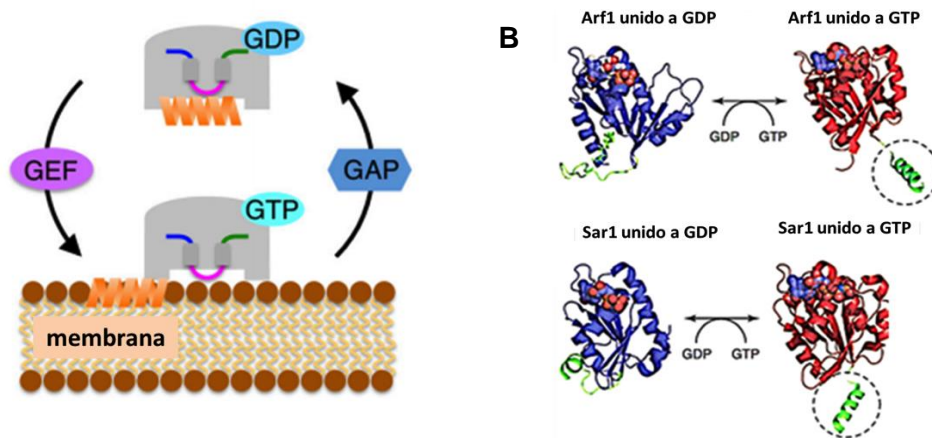


Figura 8. Ciclo de las proteínas GTPasas y su estructura. **A**, Las GTPasas oscilan entre un estado activo GTPasa-GTP y uno inactivo GTPasa-GDP. El intercambio de GTP está mediado por GEF, mientras que la hidrólisis de GTP a GDP está asistida por GAP. Imagen tomada de Yorimitsu *et al.*, 2014. **B**, Estructura en 3D de las GTPasas ARF1/SAR1 en unión a GDP o GTP. El intercambio de GDP por GTP induce un cambio conformacional que expone el extremo N-terminal (círculo punteado) de ARF/SAR1 unido a una cadena de miristoilo. Tomada de Pucadyil y Schmid, 2009.

Las GTPasas de la sub-familia ARF (por siglas en inglés de ADP-Ribosylation Factor) regulan la formación de las vesículas COPI y CCV, mientras que las proteínas de la sub-familia SAR1 (por siglas en inglés de Secretion-Associated RAS super family 1) controlan el ensamblaje en la formación de las vesículas COPII (Jürgens, 2004). La forma inactiva ARF/SAR1-GDP, citosólica y localizada en la periferia de la membrana donadora, es reclutada por la proteína ARF-GEF correspondiente hacia la membrana donadora. El intercambio de GDP por GTP, mediado por ARF-GEF, induce un cambio conformacional que expone una cadena de miristoilo unida covalentemente al extremo N-terminal de ARF/SAR1 (Figura 8B) y permite su inserción a la membrana donadora (Figura 9) para dar paso al reclutamiento de las subunidades estructurales de la cubierta de la vesícula y su ensamblaje (Anders y Jürgens, 2008).

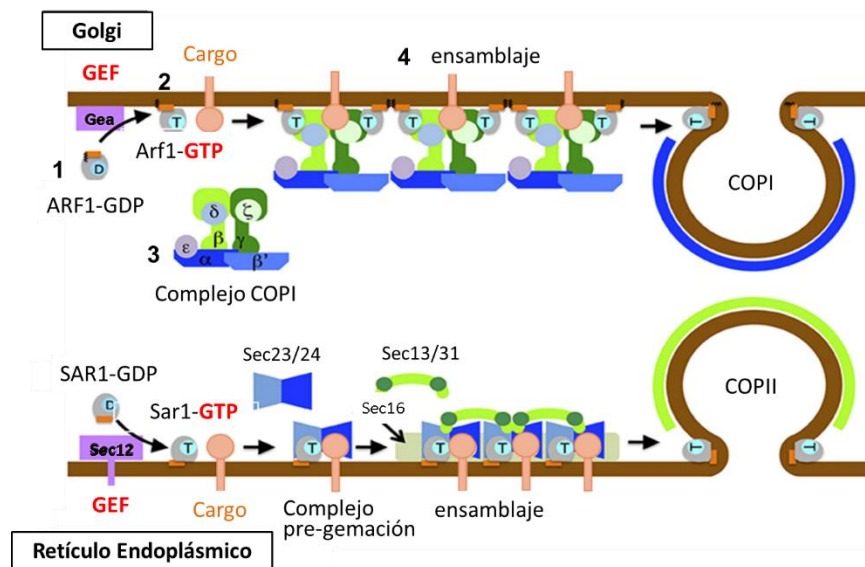


Figura 9. Ensamblaje de la cubierta de las vesículas COPI y COPII. **1,** GEF recluta a ARF/SAR-GDP hacia la membrana donadora e intercambia GDP por GTP. **2,** El cambio de conformación de ARF/SAR-GTP favorece la exposición del grupo miristoilo y su inserción a la membrana donadora. **3,** ARF/SAR-GTP recluta las subunidades estructurales de la cubierta de la vesícula. **4,** Se ensamblan los complejos estructurales de la cubierta, lo que da forma esférica a la vesícula. Modificada de Yorimitsu *et al.*, 2014.

1.6. Características de las proteínas de la familia ARF-GEF

La estructura primaria de las proteínas ARF-GEF se caracteriza por la presencia de un dominio, de aproximadamente 200 aminoácidos, denominado Sec7, por su homología con la proteína de levadura Sec7p. Este dominio comprende 10 alfa-hélices (αA - αJ), separadas en dos sub-dominios por un surco hidrofóbico expuesto al solvente (Casanova, 2007). Es el dominio Sec7 el que cataliza el intercambio de GDP a GTP en las GTPasas ARF. De acuerdo a datos de cristalografía, el mecanismo intercambiador GDP-GTP de las proteínas ARF involucra un residuo de ácido glutámico (Glu, E) muy conservado, que se localiza en un asa hidrofílica que se forma entre las hélices 6 y 7 del dominio Sec7, referido como “dedo glutámico” (en inglés: “glutamic finger”). Este residuo Glu se inserta en el sitio de unión a GDP y desplaza el fosfato beta del nucleótido, lo que desestabiliza la unión a GDP (Casanova, 2007).

En función a su estructura y organización de dominios, las proteínas ARF-GEF se clasifican en cinco sub-familias, cuatro de las cuales son específicas de metazoa. A saber, las sub-familias denominadas ARNO/citohesina, EFA6 (por siglas en inglés: “Exchange Factor for Arf6”), BRAG (por siglas en inglés: “Brefeldin-resistance Arf GEF”) y FBX8 (por siglas en inglés: “F-box only protein 8”). Mientras que la sub-familia GBF/BIG (por siglas en inglés: “Golgi BFA-sensitive factor1/BFA Inhibited GEF”) está presente en todos los eucariotas.

Si bien la sub-familia GBF/BIG en plantas ha sido estudiada principalmente en las plantas modelo *A. thaliana*, en cuyo genoma se identificaron cinco genes *BIG* (*BIG1-5*) y tres genes *GBF*: *GNOM*, *GNL1* (*GNOM-like 1*) y *GNL2* (*GNOM-like 2*), y *N. tabacum*, un análisis preliminar de bases de datos genómicos mostró que los genes GBF y BIG existen en los organismos del subreino Viridiplantae (R. Sánchez López, resultados no publicados), que agrupa las algas verdes y las plantas terrestres.

La sub-familia GBF/BIG se caracteriza por presentar seis dominios (Figura 10): un **dominio DCB** (por sus siglas en inglés: “Dimerization and Cyclophilin Binding”), de aproximadamente 150 aminoácidos localizado cerca del extremo N-terminal; un **dominio HUS1** (por sus siglas en inglés: “Homology Upstream of Sec7 domain 1”) que contiene un motivo conservado N(Y/F)DC(D/N), llamado caja HUS, cuya función es aún desconocida; el **dominio Sec7**; y los **dominios HDS1-3** (por sus siglas en inglés: “Homology Downstream of Sec7”) hacia el extremo C-terminal.

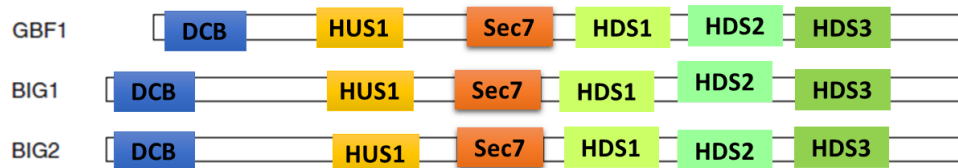


Figura 10. Representación esquemática de la estructura primaria de las proteínas GBF1, BIG1 y BIG2 de la familia ARF-GEF, constituidas por los dominios conservados: DCB, HUS1, Sec7 y HDS (HDS1, HDS2 y HDS3). Modificado de Casanova, 2007.

Una de las propiedades bioquímicas que caracteriza a varias de las proteínas de la sub-familia GBF/BIG, es su sensibilidad (efecto inhibitorio) o resistencia a la toxina fúngica Brefeldina A o BFA. El modelo propuesto como mecanismo de inhibición de GBF/BIG por BFA se basa en la estructura 3D de un complejo formado, en presencia de BFA, por la proteína humana ARF1-GDP y el dominio Sec7 de la proteína de levadura ARF1-GEF, sensible a la BFA. Los datos cristalográficos indican que la BFA se une al complejo ARF-GDP-dominio Sec7 e inhibe los cambios conformacionales en ARF1, necesarios para que Sec7 desaloje a GDP (Figura 11; Mossessova *et al.*, 2003; Teh y Moore, 2007). De donde BFA ha sido ampliamente utilizada en el estudio de transporte vesicular ya que inhibe el intercambio GDP por GTP en aquellos complejos formados por ARF-GDP y ARF-GEF sensible a BFA. Por lo tanto, en presencia de LA BFA no se reclutan las subunidades estructurales de la cubierta de la vesícula correspondientes (Nebenführ *et al.*, 2002; Ritzenthaler *et al.*, 2002; Tse *et al.*, 2007).

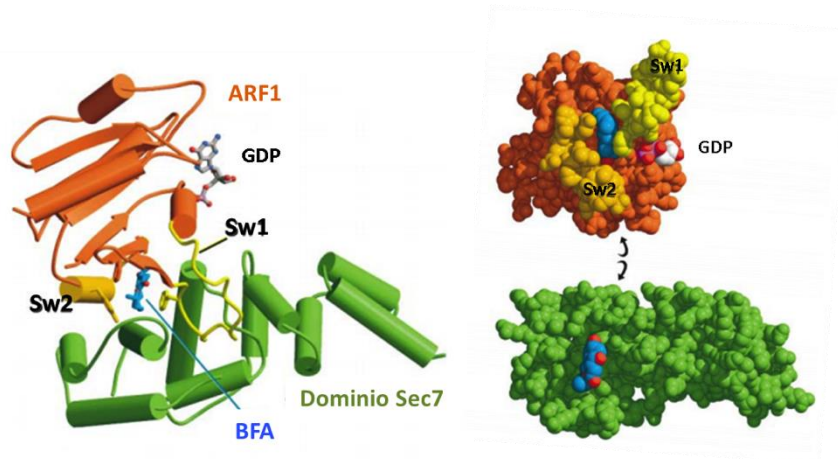


Figura 11. Estructura 3D del complejo ARF-GDP-Sec7-BFA. Dominio Sec7 representado en verde y la BFA en azul; la proteína ARF1 en color naranja, en amarillo las regiones “switch” 1 (Sw1) y 2 (Sw2), un conector interno o “interswitch” que es desplazado durante la unión a GTP. Imagen tomada de Mossessova *et al.*, 2003.

1.7. Las proteínas ARF-GEF conocidas como GNOM, GNL1 y GNL2, específicas de plantas

GNOM es una proteína sensible a BFA, de 1451 aminoácidos, específica de plantas, que pertenece a la sub-familia GBF/BIG. Es de mencionar que la función de GNOM ha sido caracterizada, principalmente, en *A. thaliana* y células de *N. tabacum* en cultivo (Bassham *et al.*, 2008; Paez-Valencia *et al.*, 2016).

Fue el primer intercambiador ARF-GEF en ser descrito en plantas e identificado gracias al mapeo del gen responsable del fenotipo de las mutantes alélicas *gnom* (“*gnomo*”, en alemán) y *emb30* (“*embryo defective*”) de *A. thaliana*, aisladas por grupos de investigación independientes (Mayer *et al.*, 1991; Meinke, 1991; Mayer *et al.*, 1993; Shevell *et al.*, 1994; Franzmann *et al.*, 1995). El análisis fenotípico de estas mutantes mostró que están afectadas en un gen esencial en el desarrollo temprano del embrión ya que contribuye a la formación de la polaridad del eje apical-basal del embrión de *A. thaliana* (Mayer *et al.*, 1993). En el cigoto tipo

silvestre, el patrón del eje apical-basal se establece en la primera división celular, que es asimétrica, y da como resultado dos células hijas: una célula apical pequeña, que dará origen a los cotiledones y al brote, y la célula basal grande y alargada que formará el suspensor (Möller y Weijers, 2009). La división del cigoto *gnom* es simétrica, generando una célula apical casi de un tamaño similar al de la célula basal, lo que sugiere que el gen *GNOM* es esencial en el estadio de una célula (“one-cell stage”). La pérdida de función de los alelos *gnom* en *A. thaliana* desencadena graves defectos en la alineación célula-célula y en el establecimiento del eje embrionario. Muchos de esos alelos, descritos en el Anexo 1, llevan mutaciones sin sentido situadas antes o dentro del dominio central catalítico Sec7 (Figura 12).

En *A. thaliana*, el gen *GNOM* se expresa durante el desarrollo embrionario en las etapas de corazón y torpedo. En plántulas, *GNOM* se expresa en el ápice de la raíz, el meristemo de las células del cilindro vascular; el estudio de los primordios de las raíces laterales y de la hoja, ha demostrado que *GNOM* está involucrando en el desarrollo del sistema vascular y en la venación de los cotiledones (Geldner *et al.*, 2004; Koizumi *et al.*, 2005).

La caracterización funcional de la proteína AtGNOM evidenció su papel en la actividad de reciclaje de proteínas de endosoma a MP (Otegui y Spitzer, 2008; Luschnig y Vert, 2014), por lo que le considera como un marcador de endosoma de reciclaje en plantas. Por otro lado, se encontró que en las células de mutantes *gnom*, se forman unas estructuras subcelulares similares a los compartimentos que se observan cuando las células vegetales de tipo silvestre son incubadas en presencia de BFA (Lam *et al.*, 2009). Los resultados de la caracterización de estos compartimentos, confirmaron que la BFA inhibe la actividad de GNOM, de donde hoy en día se les conoce como compartimentos tipo BFA, y además sentaron las bases que contribuyeron a la demostración de que en células vegetales el TGN y el endosoma forman un compartimento, híbrido, TGN/EE (Lam *et al.*, 2009).

Por su actividad celular, GNOM y la BFA también han sido herramientas clave en la caracterización funcional del transportador de auxinas, PIN1 y su reciclaje a la MP (Nebenführ *et al.*, 2002; Geldner *et al.*, 2003).

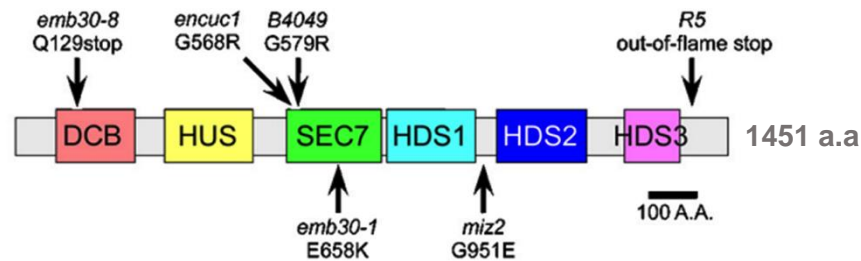


Figura 12. Estructura primaria de la proteína GNOM. Se muestran los seis dominios característicos de la sub-familia GBF/BIG. Las flechas indican las posiciones de las mutaciones mapeadas en los alelos *gnom* que conducen a una variedad de fenotipos. Imagen tomada de Koizumi *et al.*, 2005.

Los homólogos más cercanos a GNOM, son las proteínas GNL1 y GNL2 (acrónimo de GNOM-like1 y 2) de 1443 y 1375 aminoácidos, respectivamente. *AtGNL1* es resistente a BFA (Richter *et al.*, 2007), mientras que GNL1 de *N. tabacum* es sensible a BFA. No obstante, *AtGNL1* y *NtGNL1* comparten la función de regular la formación de vesículas COPI. Otra de las posibles funciones de *NtGNL1* está asociada a la endocitosis. Jelínková y cols. (2015) observaron que el tratamiento con BFA inhibe la endocitosis de FM4-64 en células de tabaco.

Las plantas mutantes *gnl1* de *A. thaliana* son viables y fértiles, con un fenotipo de planta tipo arbusto (“bush-plant”; Richter *et al.*, 2007). En el caso de *NtGNL1*, la literatura indica que tiene un papel esencial en el crecimiento y orientación de los tubos polínicos (Fanglei *et al.*, 2010). Sorprendentemente *AtGNOM* rescata el fenotipo de la mutante *gnl1* de *A. thaliana*, por el contrario *AtGNL1* es incapaz de substituir la función de *AtGNOM* (Richter *et al.*, 2007).

Poco se ha investigado sobre la función de GNL2; se sabe que en *A. thaliana* es

sensible a BFA y es esencial para la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico (Jia *et al.*, 2009).

Respecto a la sensibilidad y resistencia a BFA en GNOM y GNL2, *versus* GNL1, respectivamente, la literatura sugiere que el residuo Leu696 presente en el dominio Sec7 es el que confiere la resistencia a BFA en AtGNL1, mientras que en AtGNOM y AtGNL2 esta posición corresponde a un residuo Met (696 y 629, respectivamente). Se encontró que la versión de AtGNOM M696L es resistente al tratamiento con BFA. Resultados similares fueron obtenidos al analizar la versión mutada NtGNL1 M683L, es decir, adquiere resistencia a BFA (Wang *et al.*, 2008).

1.8 Visualización del proceso de endocitosis mediante el uso de colorantes lipofílicos fluorescentes de la serie FM

Dado que las células vegetales se encuentran rodeadas por una pared celular, por lo tanto son más rígidas que las células animales, durante mucho tiempo se consideró que las células vegetales eran incapaces de endocitar. Sin embargo, estudios recientes han refutado esta hipótesis utilizando estrategias como la identificación de genes de endocitosis en genomas de plantas y el uso de marcadores para la visualización *in vivo* de la endocitosis, tales como los colorantes estirilo de la serie FM, el antibiótico filipina y las proteínas membranales fusionadas a GFP (“Green Fluorescent Protein”), YFP (“Yellow Fluorescent Protein”), u otras (Bolte *et al.*, 2004; Malínská *et al.*, 2014). Hoy en día, se sabe que la endocitosis es muy activa en células vegetales, a pesar de la elevada presión de turgencia (Baluška y Wan, 2012).

Los colorantes estirilo de la serie FM son herramientas muy útiles para el seguimiento de la endocitosis *in vivo*; son marcadores fluorescentes, originalmente desarrollados como sensores potenciales de membrana, y han sido ampliamente usados en la caracterización de proteínas de la MP y estudios de la regulación de

la actividad de los receptores mediada por endocitosis (Fan *et al.*, 2015; Jelínková *et al.*, 2010). Los marcadores FM más utilizados comúnmente en plantas son FM4-64 y FM1-43 (Bolte *et al.*, 2004; Malínská *et al.*, 2014). La Figura 13 muestra el típico marcaje de la MP y el patrón punteado intracelular que refleja la alta actividad endocítica en la región apical del pelo radical de *A. thaliana*.

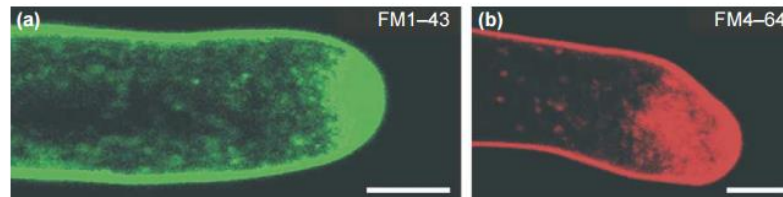


Figura 13. Imágenes representativas de la visualización *in vivo* de la endocitosis de colorantes FM1-43 (a) y FM4-64 (b) en pelo radical de *A. thaliana*. Barras: 4 μ m. Imagen tomada de Šamaj *et al.*, 2006.

La abreviación “FM” está dada en honor al químico Fei Mao, quien sintetizó estos colorantes (Bolte *et al.*, 2004). Estructuralmente los marcadores de la serie FM son moléculas anfifílicas fluorescentes (Figura 14A), compuestos por una cabeza con carga positiva que previene su penetración a través de la MP, un puente cuya composición determina la longitud de onda de la fluorescencia (Figura 14B) y una cola responsable de la lipofilicidad, lo que permite que la molécula FM se intercale eficientemente en la capa externa de la bicapa lipídica de la MP (Bolte *et al.*, 2004; Malínská *et al.*, 2014).

El uso de estas sondas fluorescentes en el estudio de la endocitosis *in vivo* se basa en la pre-incubación de células en presencia de FM4-64 o FM1-43 y el rastreo, por microscopía de fluorescencia, de la incorporación de la sonda a MP y su redistribución subcelular gracias a la actividad endocítica de la célula. Por endocitosis se internalizan porciones de MP que constituyen la membrana de vesículas endocíticas, las cuales, por fusión de membranas se incorporan al

entorno endomebranoso o son reciclados a la MP, mediante reciclaje endosomal o bien por exocitosis (Rigal *et al.*, 2015).

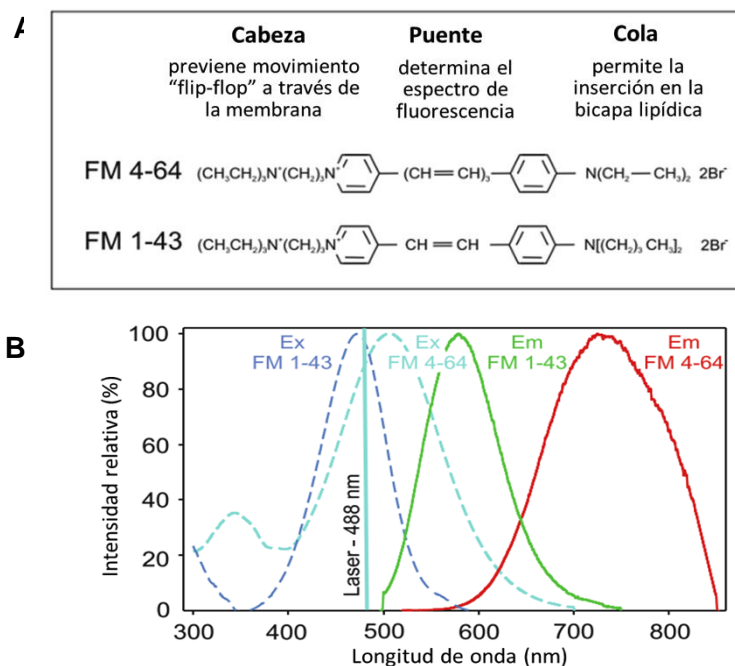


Figura 14. Estructura de los colorantes FM4-64 y FM1-43. **A**, Comparación de las regiones de la cabeza, puente y cola de ambas moléculas. **B**, Espectros de excitación (líneas punteadas) y emisión de los marcadores FM (líneas continuas). Imagen tomada de Malínská *et al.*, 2014.

1.9. Antecedentes

1.9.1 Acumulación de transcrito de los genes *PvGNOM* en diferentes secciones de la raíz de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa

En un estudio previo realizado en nuestro grupo, cuyo objetivo fue la identificación de genes de *P. vulgaris* involucrados en la endocitosis en pelos radicales, sitio de inicio de la nodulación, se encontró que en el genoma de esta leguminosa hay tres genes homólogos de *AtGNOM* (Tesis de licenciatura de Elizabeth Monroy Morales). En base al porcentaje de identidad respecto a la secuencia peptídica de

AtGNOM (Anexo 2), los genes *PvGNOM* fueron nombrados *PvGNOM1* (81.1 %), *PvGNOM2* (71.7 %) y *PvGNOM3* (68.2 %). La identidad de secuencia con *AtGNL1* es menor, de 62.1 %, 59.9 % y de 58.3 %, respectivamente (Anexo 2). La estructura primaria de las proteínas *PvGNOM* presenta la organización de dominios típica de *GNOM* y otros miembros de la sub-familia GBF/BIG (Figura 12). Las proteínas *PvGNOM1* y *PvGNOM2* están constituidas por 1473 aminoácidos, mientras que *PvGNOM3* tiene 1463 residuos. *PvGNOM1* y *PvGNOM2* presentan un residuo de Met en la posición 696, de donde se infiere una posible sensibilidad a BFA, mientras que en *PvGNOM3* esta posición la ocupa un residuo Leu, que sugiere resistencia a BFA.

Por ensayos de RT-qPCR con oligos gene-específicos se determinó el patrón de acumulación de transcrito de los genes *PvGNOM* en secciones de raíz de plántulas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa de 48 hrs post-germinación. Las secciones analizadas fueron el ápice, los pelos radicales y la raíz rasurada (desprovista de ápice y pelos radicales). El ápice de la raíz es una zona con alta tasa de división celular o actividad meristemática. La sección raíz rasurada incluye las zonas de elongación y de diferenciación de la raíz y el sistema vascular. Como su nombre lo indica, en la sección pelos radicales están los pelos radicales en diferentes etapas de desarrollo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15. Se encontró que los tres genes *PvGNOM* se expresan en las tres secciones de raíz de *P. vulgaris* analizadas. En pelos radicales *PvGNOM1* tiene una mayor acumulación de transcrito con respecto a los otros dos genes. Mientras que *PvGNOM3* presenta una mayor acumulación de transcrito en el ápice, seguido de *PvGNOM2* y *PvGNOM1*. La acumulación de transcrito de los tres genes *PvGNOM* presenta un patrón similar en la raíz rasurada (Elizabeth Monroy Morales, resultados no publicados).

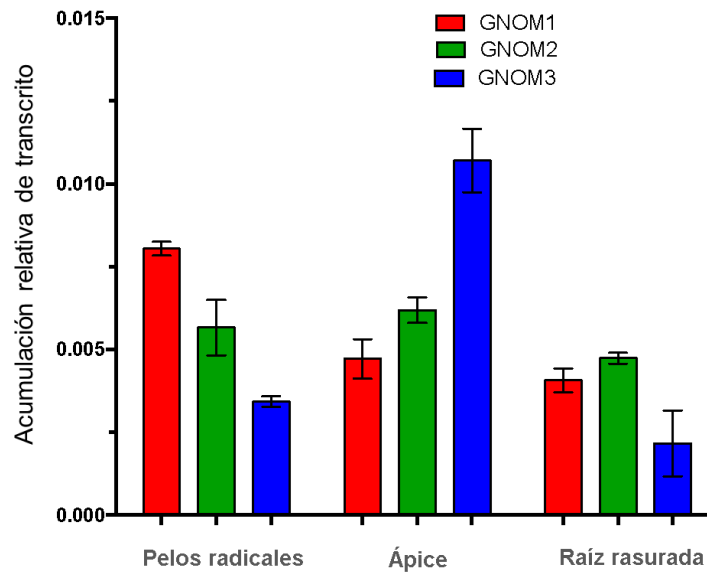


Figura 15. Patrón de acumulación de transcrito de *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3* en secciones de raíz de *P. vulgaris*. Mediante ensayos de RT-qPCR en muestras de RNA extraído de pelos radicales, ápice y raíces rasuradas (raíces desprovistas de pelos radicales), cosechados a partir de plántulas de 2 dpv, se determinó la acumulación relativa de los transcritos *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3*. Como referencia se empleó el nivel de acumulación de transcrito de el Factor de Elongación 1 alfa, *EF1α* (por siglas en inglés de Elongation Factor 1 α). Se grafica el valor promedio obtenido del análisis de 2 muestras biológicas independientes (3 réplicas técnicas por muestra). Barra: error estándar.

2. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento del pelo radical y su reactividad a los factores Nod, así como la formación del hilo de infección dependen de la deposición y recambio de componentes de membrana plasmática y pared celular; a su vez, el nódulo tiene su origen en la división de células del córtex de la raíz. Por otro lado, se sabe que las actividades endocítica y exocítica son clave para el inicio de la nodulación; sin embargo, la actividad de reciclaje endosomal, que permite que algunos de los componentes de la MP que entran por endocitosis regresen a MP, así como su papel en la infección con rizobia, división celular y organogénesis del nódulo son aspectos de la biología celular de la nodulación que aún no han sido explorados.

La proteína GNOM, específica de plantas, tiene un papel esencial en el reciclaje endosomal. La ausencia de esta proteína altera el patrón de división celular, la organización celular, el transporte de auxina, entre otros procesos. En qué medida los genes *GNOM* participan en el proceso de nodulación es un tema no investigado, que representa un reto interesante. En este proyecto planteamos analizar el papel de los genes *GNOM* en la nodulación en *P. vulgaris* utilizando una estrategia de genética reversa, el silenciamiento mediado por RNAi.

3. HIPÓTESIS

La función de alguno de los genes *GNOM*, homólogos a *AtGNOM*, es esencial para el inicio del proceso de la nodulación en *P. vulgaris*.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto fenotípico del silenciamiento de los genes *PvGNOM* en la nodulación en raíces transgénicas de *P. vulgaris*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar lotes de raíces transgénicas de *P. vulgaris* silenciadas en la expresión de *PvGNOM1*, *PvGNOM2* o *PvGNOM3*.
2. Evaluar la capacidad de nodulación de las raíces transgénicas de *P. vulgaris* silenciadas en la expresión de cada gen *PvGNOM*.
3. Analizar la endocitosis del marcador fluorescente FM1-43 en pelos radicales de plántulas silvestres y en raíces transgénicas *P. vulgaris* silenciadas en los genes *PvGNOM*.
4. Explorar el efecto del inhibidor BFA sobre la endocitosis en células corticales de raíces transgénicas *P. vulgaris* no silenciadas.

5. METODOLOGÍA

5.1 Esterilización de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa)

El tratamiento de esterilización de las semillas se realizó en campana de flujo laminar. Se lavaron las semillas de frijol, aproximadamente 80 semillas, con agua de la llave, este paso se repitió varias veces, aproximadamente se hicieron seis o más lavados hasta que el frijol quedó limpio; se seleccionaron las semillas que físicamente se veían en buen estado, que tenían la testa completa y que no estaban hinchadas.

Se esterilizaron las semillas con etanol industrial al 100 %, durante un minuto, con breve agitación manual. Enseguida se realizaron aproximadamente tres lavados con agua destilada estéril (el agua destilada debe cubrir la cantidad de semillas a esterilizar, se agitan manualmente durante 10 segundos y se retira el agua destilada) hasta eliminar el olor a etanol industrial.

Después a las semillas se les agregó cloro al 20 %, diluido del producto comercial Cloralex (como la solución al 100 %), durante 5 minutos. Enseguida se retiró el cloro haciendo una serie de lavados, de cuatro a cinco aproximadamente, con agua destilada estéril hasta eliminar el olor a cloro. Finalmente se dejaron secar al aire las semillas, dentro de la campana de flujo laminar y se guardaron a 4°C.

5.2 Germinación de semillas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa

La germinación se hizo en campana de flujo laminar y consistió en colocar las semillas Negro Jamapa de manera alternada y en una sola orientación, previamente esterilizadas, sobre un papel absorbente estéril, en el fondo de una charola de acero inoxidable, al que se le agregó medio Fähræus estéril, el cual contiene CaCl₂, 90 mM; MgSO₄, 58.8 mM; KH₂PO₄, 73 mM; Na₂HPO₄, 1.08 mM; FeC₆H₅O₇, 204 mM y trazas Gibson: MnSO₄, 120 µM; ZnSO₄, 76.5 nM; H₃BO₃, 460 µM; CuSO₄, 32 nM y H₂MoO₄, 38.8 nM.

Finalmente, se cubre la charola con papel aluminio y se incuba en posición ligeramente inclinada, a 28°C durante 48 hrs.

5.3 Diseño de oligonucleótidos para amplificar los fragmentos RNAi (*PvGNOM1-i*, *PvGNOM2-i* y *PvGNOM3-i*)

Para identificar las secuencias no conservadas, base del diseño del par de oligonucleótidos transcrito-específico, se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias de transcrito de *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3* utilizando el programa ClustalX-2.1. Paso seguido, se hizo una exploración manual de las secuencias no conservadas con el propósito de ubicar fragmentos de entre 150-200 nucleótidos a ser amplificados. El diseño de los pares de oligonucleótidos específicos (19 a 25 bases de longitud; Tabla 1) se basó en la secuencia de los extremos 5' y 3' de dichos fragmentos, encontrados en la secuencia 3'UTR (Anexo 3). Es requisito que las secuencias de los oligonucleótidos no formen horquillas (*hairpins*) internas, ni sean complementarias entre sí, para lo cual la secuencia de cada oligonucleótido fue analizada en el sitio web <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.

Otro requisito de los oligonucleótidos es tener una $T_m > 58^\circ\text{C}$ y un contenido rico en GC (Guanina y Citocina), aproximadamente del 50 % (cálculo en el sitio web <http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>). Finalmente, cada par de oligonucleótidos fue sintetizado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.4 Amplificación de los fragmentos *PvGNOM1-i*, *PvGNOM2-i* y *PvGNOM3-i*

La amplificación de los fragmentos RNAi específicos de los transcritos *PvGNOM* se llevó a cabo mediante ensayos de RT-PCR. La mezcla de PCR incluyó la

enzima DNA polimerasa comercial Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), el par de oligonucleótidos gene-específicos y cDNA total de ápice de raíz de *P. vulgaris* en un volumen final de 20 µl. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: un ciclo a 98°C/30 segundos; 30 ciclos a 98°C/10 segundos, 58, 59 o 60°C/15 segundos y 72°C/15 segundos. Posteriormente, para visualizar y validar el tamaño del producto amplificado, se analizaron 10 µl de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en presencia de bromuro de etidio (10 µg/ml). El tamaño esperado de los productos PvGNOM1-i, PvGNOM2-i y PvGNOM3-i corresponde a 191, 171 y 165 pb, respectivamente

5.5 Clonación de insertos en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®

Los productos de PCR a ser clonados se purificaron con el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) y eluyeron en 30 µl de H₂O tetradestilada estéril. Se determinó la concentración de los productos purificados por medio de nano-espectrofotometría (NanoDrop 2000, ThermoScientific).

La clonación del inserto (producto de PCR) se realizó en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO (Invitrogen, Figura 16), un plásmido de 2580 pb del sistema Gateway (Gateway® Cloning, Invitrogen), diseñado para una clonación direccional, rápida y eficiente de productos de PCR. En este vector, el sitio de clonación está flanqueado por los sitios *attL1* y *attL2*, esenciales para la recombinación en vectores destino compatibles con el sistema Gateway y un gen de resistencia a kanamicina (Kan^R). La reacción de clonación se llevó a cabo conforme a las especificaciones del protocolo en línea pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits (Invitrogen), en breve: se hizo una mezcla de reacción con una relación molar pENTR™/D-TOPO: inserto de 1:10 en un volumen final de 6 µl (ajustados con H₂O tetradestilada) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se utilizaron 2 µl de esta mezcla para electroporar *E.coli* DH5α con un pulso de electricidad de 1.60 V (voltios). Las bacterias se resuspendieron en 900 µl de medio SOC y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Se inocularon 100 µl de la

suspensión bacteriana en medio LB sólido con kanamicina 50 µg/ml y se incubó a 37°C durante 16 hrs. Por medio de ensayos de PCR en colonia y secuenciación (en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología-UNAM), se identificaron las clonas bacterianas positivas, es decir, que portan el plásmido con inserto en la orientación correcta (pENTR-inserto) se preservaron a -62°C en glicerol 15 %.

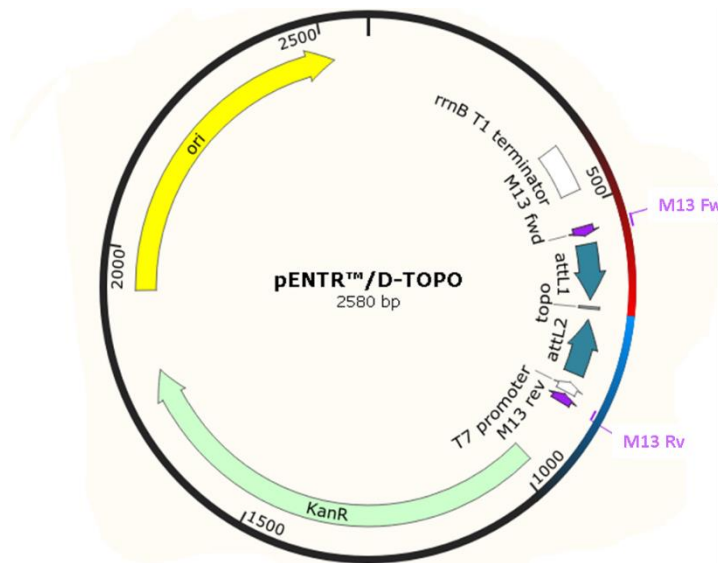


Figura 16. Esquema del vector de entrada pENTR™-D/TOPO. Se indican los sitios *attL1* y *attL2*, esenciales para la recombinación en un vector destino compatible con el sistema Gateway (Invitrogen), el sitio del diseño de los oligonucleótidos M13 Fw y M13 Rv, que permiten verificar por PCR y secuenciación la clonación de los fragmentos y su direccionalidad, la posición del gen de resistencia a kanamicina (Kan^R) y el origen de replicación en *E. coli* (ori).

5.6 Técnica de PCR en colonia

Este método permite identificar qué colonias bacterianas portan plásmido con inserto de interés. El ensayo consistió en lo siguiente: se resuspendió una asada de la colonia bacteriana en un volumen de 20 µl de H₂O tetradesilada estéril en tubo Eppendorf, posteriormente, se lisaron las bacterias mediante tres ciclos de

congelación (-62°C), ebullición (100°C) y agitación en vórtex (10 seg). El lisado se centrifugó a 12, 000 g/1 minuto y se utilizó 1 µl del sobrenadante como templado en una reacción de PCR de 25 µl. Para la mezcla de PCR se utilizó: buffer con KCl 10X (2.5 µl), MgCl₂ 25 mM (1.6 µl), dNTP's 10 mM (0.5 µl), par de oligonucleótidos M13 Fw y M13 Rv o gene-específicos y 2 µl de la enzima recombinante Taq DNA Polymerase LC 1U/µl (Thermo Scietific). Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a 98°C/2 minutos, 35 ciclos a 98°C/10 segundos, 55°C/15 segundos, 72°C/45 segundos y 1 ciclo a 72°C/7 minutos. Como templado en la reacción de control positivo de amplificación se utilizó el fragmento usado como inserto en la clonación correspondiente. Como control negativo usó la mezcla de reacción sin templado. Finalmente, se analizaron 10 µl de mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en presencia de bromuro de etidio (10 µg/ml).

5.7 Recombinación en el vector destino pTdT-RNAi

El vector de expresión en plantas que se seleccionó para este proyecto es el plásmido binario pTdT-RNAi (Figua 17), un plásmido destino compatible con el sistema Gateway. Contiene sitios dobles de recombinación *in vitro* (*attR1* y *attR2*), donde el segundo inserto se recombina invertido respecto al primero. También contiene un cassette que dirige la expresión de la proteína reportera roja fluorescente, tdTomato (por sus siglas en inglés de Tandem dimer Tomato), cuya máxima de excitación y emisión se observa a 554 nm y 581 nm, respectivamente. La proteína tdTomato permite la selección de las raíces transgénicas. Este plásmido incluye un gen de resistencia a espectinomicina (Sm^R), como marcador de selección de colonias bacterianas. Los fragmentos *PvGNOM1-i*, *PvGNOM2-i* y *PvGNOM3-i* fueron clonados en el vector pTdT-RNAi por recombinación *in vitro* a partir de las construcciones en pENTR-inserto respectivas, utilizando la enzima recombinasa comercial Gateway® LR Clonase® II (Invitrogen). Para la recombinación se procedió de la siguiente manera: se hizo una mezcla de vector

pTdT-RNAi (150 ng) y pENTR-inserto (relación molar 1:1) en un volumen final de 8 μ l, ajustados con buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1mM. Se agregó 1 μ l de la enzima recombinasa y se incubó a 23°C durante 60 minutos, posteriormente se electroporaron (pulso de 1.6 V) 4 μ l de esta reacción en *E. coli* DH5 α electrocompetentes, disponibles en el laboratorio. A las bacterias electroporadas se le adicionaron 800 μ l de medio líquido SOC y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después, 100 μ l de las bacterias se inocularon en cajas Petri con medio LB con espectinomicina (50 μ g/ml) y se incubaron a 37°C durante 16 hrs. Las clonas bacterianas que portan la construcción en pTdT-RNAi respectiva (por ejemplo pTdT-PvGNOM1-i) se identificaron por PCR en colonia.

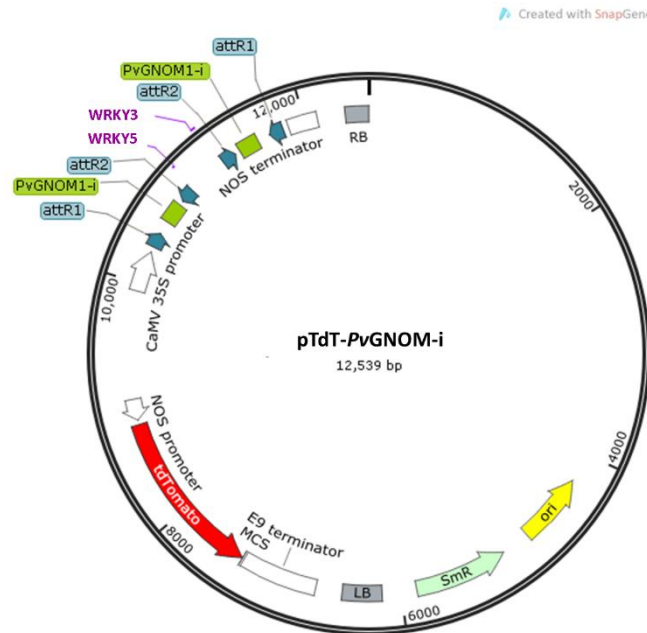


Figura 17. Esquema de la construcción pTdT-PvGNOM1-i. Se indican los sitios dobles, invertidos, de recombinación *in vitro* (*attR1* y *attR2*), los oligonucleótidos WRKY5 y WRKY3 diseñados río arriba de los sitios de recombinación *attR2* para validar la doble direccionalidad y orientación de los insertos cuando se clona un fragmento de interés en este vector, un cassette de expresión de la proteína reportera tdtomato, que codifica para una proteína roja fluorescente (tdTomato) que permite la selección de raíces transgénicas y el gen de resistencia al antibiótico espectinomicina para la selección de las bacterias transformadas.

5.8 Purificación del plásmido de las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas

Se inocularon 3 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente con una asada de la clona bacteriana que resultó positiva en el análisis por PCR en colonia y se incubaron a 37°C por aproximadamente 16 hrs. Se extrajo el DNA plasmídico utilizando el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). De acuerdo al siguiente protocolo: se centrifugó 2.5 ml de cultivo (12, 000 g/ 2 minutos), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 250 μ l de "Cell Resuspension Solution", en seguida se agregaron 250 μ l de la solución "Cell Lysis Solution" y 8 μ l de "Alkaline Protease Solution". Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se agregaron 350 μ l de "Neutralization Solution" y se centrifugó (12, 000 g/10 minutos). Se pasó el sobrenadante a una columna y se procedió a centrifugar durante 1 minuto. Se eliminó el efluente, se agregaron 750 μ l de "Wash Solution" y se centrifugó durante 1 minuto. Se colocó la columna en otro tubo Eppendor estéril, se agregaron 50 μ l de H₂O tetradestilada y, para recuperar el DNA plasmídico eluido, se centrifugó a 12, 000 g por 1 minuto. La pureza del DNA plasmídico se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1 % en presencia de bromuro de etidio (10 μ g/ml) y se determinó su concentración por nano-espectrofotometría (NanoDrop 2000, ThermoScientific). El DNA plasmídico se almacenó a -20°C.

5.9 Generación de raíces pilosas de *P. vulgaris* mediante el sistema de transformación con *Agrobacterium rhizogenes* K599

Para la transformación de *A. rhizogenes* K599: se mezclaron 200 ng del plásmido correspondiente (por ejemplo pTdT-PvGNOM-i) con *A. rhizogenes* K599 quimio-competentes, disponibles en el laboratorio, y se dejaron en hielo durante 30 minutos para después dar un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Inmediatamente, se agregaron 800 μ l de medio SOC, y la suspensión bacteriana se incubó a 30°C con agitación durante 60 min. Se plaquearon 100 μ l bacterias en

cajas Petri con medio LB sólido y espectinomicina (50µg/ml) y se incubaron a 30°C durante 48 hrs. Las colonias resultantes se analizaron por PCR en colonia. Las clonas seleccionadas se preservaron en glicerol al 40 % y se almacenaron a -62°C.

Para generar las raíces pilosas se procedió de la siguiente manera: se inocularon 100 µl de la clona *A. rhizogenes* K599 que porta la construcción de interés (por ejemplo pTdT-PvGNOM-i) en una caja Petri con medio LB y espectinomicina (50µg/ml), se incubó a 30°C durante 24 hrs. Se cosecharon las bacterias y se resuspendieron en 200 µl de agua estéril. En paralelo, se esterilizaron tubos de vidrio de 20 cm de largo y 2.5 cm de diámetro y tapa de plástico, dentro de los cuales se colocó un tubo Falcon de 15 ml con solución Fähræus y cubierto con papel aluminio horadado. Con una aguja estéril se hizo una pequeña herida en el hipocotilo de plántulas de *P. vulgaris* de 48 hrs *post-germinación*, sobre la que se colocó una gota (aproximadamente 5 µl) de la suspensión de *A. rhizogenes* K599 (Anexo 4A). En seguida, se colocaron las plántulas en los tubos de vidrio, de manera que la raíz entre al tubo Falcon a través del orificio del papel aluminio (Anexo 4B). Las plántulas inoculadas se mantuvieron en cuarto de crecimiento a 28°C, con periodos de luz/obscuridad de 16 hrs/8 hrs, hasta la formación de raíces pilosas (“*hairy roots*”), las cuales surgieron a los 10 -15 días posteriores a la inoculación. El Anexo 4 ilustra algunas de estas etapas.

5.10 Ensayos de RT-qPCR

Actualmente, la RT-qPCR (por sus siglas en inglés, Reverse Transcription quantitative PCR) es el método más sensible para detectar y cuantificar un RNA específico presente en una muestra, combina dos procesos: 1) síntesis de cDNA partir de RNA, por acción de una transcriptasa reversa, y 2) PCR cuantitativo o PCR en tiempo real con un par de oligonucleótidos específicos del transcrito de interés, como a continuación se describe:

1. Para sintetizar el cDNA, se incubaron 2 µg de RNA total, libre de DNA y 500 ng oligonucleótido oligo (dT) en un volumen de 10 µl, a 70°C durante 10 minutos, después se agregaron 8 µl de una mezcla, preparada con 1 µl de dNTP's 10 mM, 3 µl de H₂O tetradestilada estéril y 4 µl de buffer de reacción 5X, y se incubó a 42°C durante 2 minutos. En seguida, se agregó 1 µl de la enzima comercial Maxima Reverse Transcriptase (200 U/µl, Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase) y se continuó la incubación a 50°C durante 30 minutos. Por último, se inactivó la enzima a 70°C/10 minutos. El cDNA se utilizó en reacción de qPCR o se guardó a -62°C.

2. La cuantificación por qPCR se realizó en un volumen de 15 µl de reacción que contiene: 50 ng de cDNA, 7.5 µl de reactivo SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) y 4.5 µl de H₂O tetradestilada estéril. Las reacciones de qPCR se hicieron con 30 ciclos a 98°C/30 segundos, 62°C/15 segundos y 72°C/15 segundos y se llevaron a cabo en el equipo LightCycler Nano (Roche). Paralelo a las reacciones de qPCR con oligonucleótidos específicos del transcrito de interés y como referencia, para cada muestra de RNA también se hicieron reacciones con oligonucleótidos específicos del transcrito del Factor de Elongación 1 alfa, EF1α (por siglas en inglés de Elongation Factor 1 α). Cada muestra de cDNA se analizó por triplicado.

5.11 Tinción histoquímica de GUS, escaneo digital y determinación del número y diámetro de los nódulos en raíces transgénicas

Previo a la tinción histoquímica de GUS, se confirmó que las raíces fueran transgénicas, es decir, que fueran rojo fluorescentes. Las no fluorescentes se eliminaron. Las raíces transgénicas se disectaron, se colocaron en cajas Petri y se lavaron con H₂O destilada estéril. Se agregó la solución de lavado I (buffer de fosfato de Na 50 mM, pH7.2, K₃Fe(CN)₆ 0.5 mM y K₄Fe(CN)₆), cuidando que la raíz quede totalmente sumergida. Después de 5 minutos, se eliminó la solución I y

se agregó solución II (solución I con EDTA 2mM y Triton X 100 0.1 %). Al cabo de 5 minutos, se retiró la solución II. Para revelar la actividad de GUS (tinción histoquímica de GUS) se sumergieron las raíces en solución II con sustrato cromogénico X-Glu (3-bromo-4-cloro-3 indolil-6-D-glucoronido, Inalco SPA) 100 mM y se dejó progresar la reacción a 37°C durante 12-16 hrs. La reacción se paró mediante 3 lavados de las raíces con H₂O destilada estéril.

Antes de aclararlas, las raíces se desgasificaron durante 5 minutos en un sistema de trampa de agua, después se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial, Cloralex) al 1 % durante 16 o mas hrs, hasta que se observó que las raíces estuvieran aclaradas, es decir, que perdieran el color amarillento y tuvieran una apariencia traslúcida, *quasi* transparente. Con cuidado se retiró el hipoclorito de sodio y las raíces se lavaron al al menos tres veces con H₂O destilada estéril hasta eliminar el olor a cloro.

Para digitalizar imágenes de las raíces noduladas y con reacción histoquímica de GUS, se buscó que las raíces estuvieran lo mas extendidas posible en la caja Petri y se procedió a hacer un escaneo digital a color, con a una resolución de 2400 ppp en un equipo scáner (Epson Perfection 4490, PHOTO). El archivo generado se guardó en formato tiff (aproximadamente 305 MB). La determinación del número y diámetro de los nódulos en las imágenes capturadas se realizó con apoyo del programa de análisis de imágenes ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>). Para la captura, procesamiento y gráfica de datos se utilizaron los programas Excel (Microsoft Office Professional Plus, 2013), GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc).

6. RESULTADOS

6.1 Diseño de oligonucleótidos gene-específicos-RNAi de los genes *GNOM1*, *GNOM2* y *GNOM3* en el genoma de *P. vulgaris*

La exploración manual de las secuencias no conservadas entre los transcritos de *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3* permitió identificar, en el extremo 3'UTR de cada transcrito, fragmentos específicos a ser utilizados como RNAi y diseñar los pares de oligonucleótidos para su amplificación por PCR. Así mismo, los pares de oligonucleótidos específicos para ensayos de RT-qPCR fueron diseñados en base a la secuencia 5'UTR de cada transcrito. En la Tabla 1 y Anexo 3 se muestran la secuencia de los pares de oligonucleótidos diseñados y sus características.

Tabla 1. Lista de los pares de oligonucleótidos diseñados para amplificar los fragmentos RNAi específicos y para el análisis por RT-qPCR.

Oligonucleótidos para RNAi					
Gen		Secuencia	Longitud (bp)	GC (%)	Tamaño del fragmento
GNOM1	<i>PvGNOM1</i> -i Fw	5'-GAGGGGAAGTATAGTTCTCAGGC-3'	23	52	191
	<i>PvGNOM1</i> -i Rv	5'-GGTAGAAAGGGAAGCCATGCAG- 3'	22	55	
GNOM2	<i>PvGNOM2</i> -i Fw	5'-GCAGAACATCTCAGATCGCATTTCG-3'	24	50	172
	<i>PvGNOM2</i> -i Rv	5'-GCAGTTAAACCAGCACAGGCCT-3'	22	55	
GNOM3	<i>PvGNOM3</i> -i Fw	5'-GTGCCTAAGCAACCTGAATTGGC-3'	23	52	165
	<i>PvGNOM3</i> -i Rv	5'-CCTGACCAAACCTGCTCCAACCA-3'	22	55	

Oligonucleótidos para RT-qPCR					
Gen		Secuencia	Longitud (bp)	GC (%)	Tamaño del fragmento
GNOM1	<i>PvGNOM1</i> -Fw	5'-CGCCGAACAAAGCAACGC-3'	18	61	120
	<i>PvGNOM1</i> -Rv	5'-GCTTGCAGCTTCAGACGTCC-3'	20	60	
GNOM2	<i>PvGNOM2</i> -Fw	5'-AGCCATGATTTCAATGTAACACACC-3'	25	40	117
	<i>PvGNOM2</i> -Rv	5'-CAAGCAGATCTGCCTGACATTTACC-3'	24	48	
GNOM3	<i>PvGNOM3</i> -Fw	5'ACGCCTTTGAAGTTTCAGCTCACG-3'	24	50	135
	<i>PvGNOM3</i> -Rv	5'-CAACGTTTTCAAGCCTTTCAGCAG-3'	24	46	

6.2 Amplificación por PCR de los fragmentos RNAi (*PvGNOM1-i*, *PvGNOM2-i* y *PvGNOM3-i*)

Dado que los tres genes *PvGNOM* se expresan tanto en pelos radicales como en ápice y en raíz rasurada de *P. vulgaris*, para la amplificación de los fragmentos RNAi (*PvGNOM1-i*, *PvGNOM2-i* y *PvGNOM3-i*) se decidió utilizar como templado cDNA total de ápice de raíz disponible en el laboratorio. Como punto de partida, se realizaron reacciones de PCR utilizando 58, 59 y 60°C como temperatura de hibridación o alineamiento. Se obtuvo amplificación en las tres condiciones, con aparentemente la misma eficiencia (Figura 18). Los fragmentos amplificados son del tamaño esperado, 191 (*PvGNOM1-i*), 172 (*PvGNOM2-i*) y 165 pb (*PvGNOM3-i*), respectivamente.

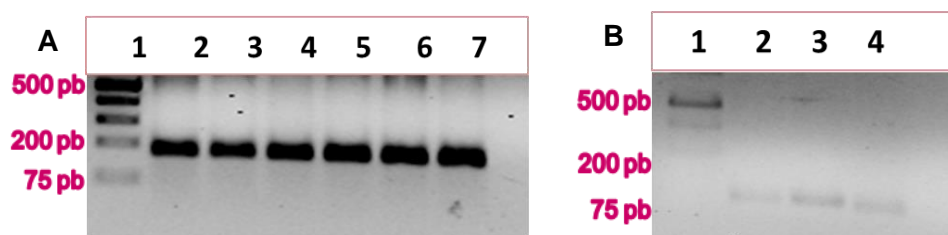


Figura 18. Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos usando un gradiente de temperatura de alineamiento para amplificar los fragmentos de *PvGNOM1-i* y *PvGNOM2-i* *PvGNOM3-i*. **A**, Carriles: 1) MPM; 2-4) amplificación de *PvGNOM1-i* y 5-7) de *PvGNOM2-i*, a 58 (carriles 2 y 4), 59 (carriles 3 y 6) y 60°C (carriles 4 y 7). **B**, Carriles: 1) MPM; 2-4) reacción *PvGNOM3-i* a 58, 59 y 60°C, respectivamente. El tamaño de los productos *PvGNOM1-i* (191 pb), *PvGNOM2-i* (171 pb), y *PvGNOM3-i* (165 pb) es acorde a lo esperado. MPM: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™, Fermentas). Se cargaron 10 µl/pozo de los 20 µl de reacción. Geles de agarosa al 2 %.

Con el propósito de tener una mayor cantidad de cada producto de PCR, se procedió a re-amplificar los fragmentos *PvGNOM1-i*, *PvGNOM2-i* y *PvGNOM3-i* obtenidos, utilizando como templado 1 µl de la reacción de PCR respectiva, realizada a la mayor temperatura de alineamiento (60°C), que en teoría favorece

una mayor especificidad en la amplificación. Como se ilustra en la Figura 19, los fragmentos RNAi son eficientemente re-amplificados y tienen el tamaño esperado.

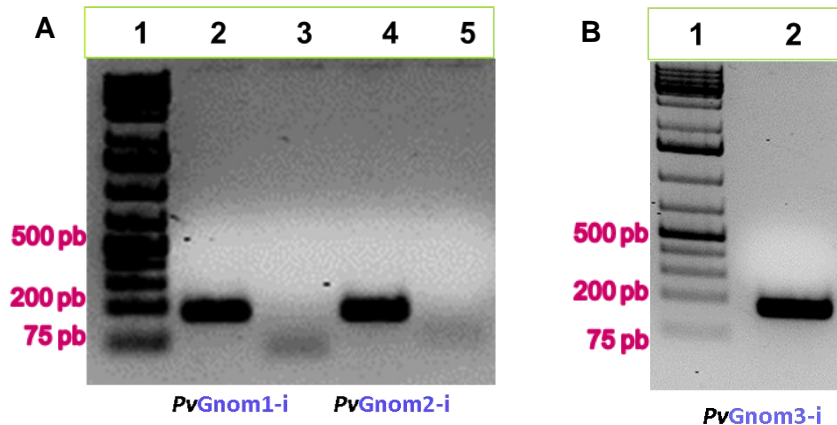


Figura 19. Análisis electroforético de los productos de la re-amplificación por PCR de los fragmentos *PvGNOM1-i* y *PvGNOM2-i* (**A**) y *PvGNOM3-i* (**B**). **A**, Carriles: 1) MPM; 2) *PvGNOM1-i*; 4) *PvGNOM2-i*; 3 y 5) controles de reacción sin templado. **B**, Carriles: 1) MPM; 2) *PvGNOM3-i*. MPM: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™, Fermentas). Se cargaron 10 µl/pozo de los 50 µl de reacción. Geles de agarosa al 2 %.

6.3 Clonación de los fragmentos RNAi amplificados en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO®

El siguiente paso fue la clonación individual de los fragmentos en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO® (2580 pb) del sistema de clonación *in vitro* Gateway® (Invitrogen). Las colonias que portan el inserto (clonas positivas) se identificaron mediante la técnica de PCR en colonia. El análisis electroforético correspondiente mostró que a partir de todas las clonas analizadas se amplificó un fragmento del tamaño acorde al inserto a ser clonado (Figura 20). Entre las clonas positivas se eligieron las que en la Figura 20 están marcadas con un asterisco rojo y se les asignó la nomenclatura pENTER-*PvGNOM1-i* C1, pENTER-*PvGNOM2-i* C6 y pENTER-*PvGNOM3-i* C9. Los resultados del análisis de secuencia de estas clonas confirmaron que los insertos clonados corresponden al fragmento correcto.

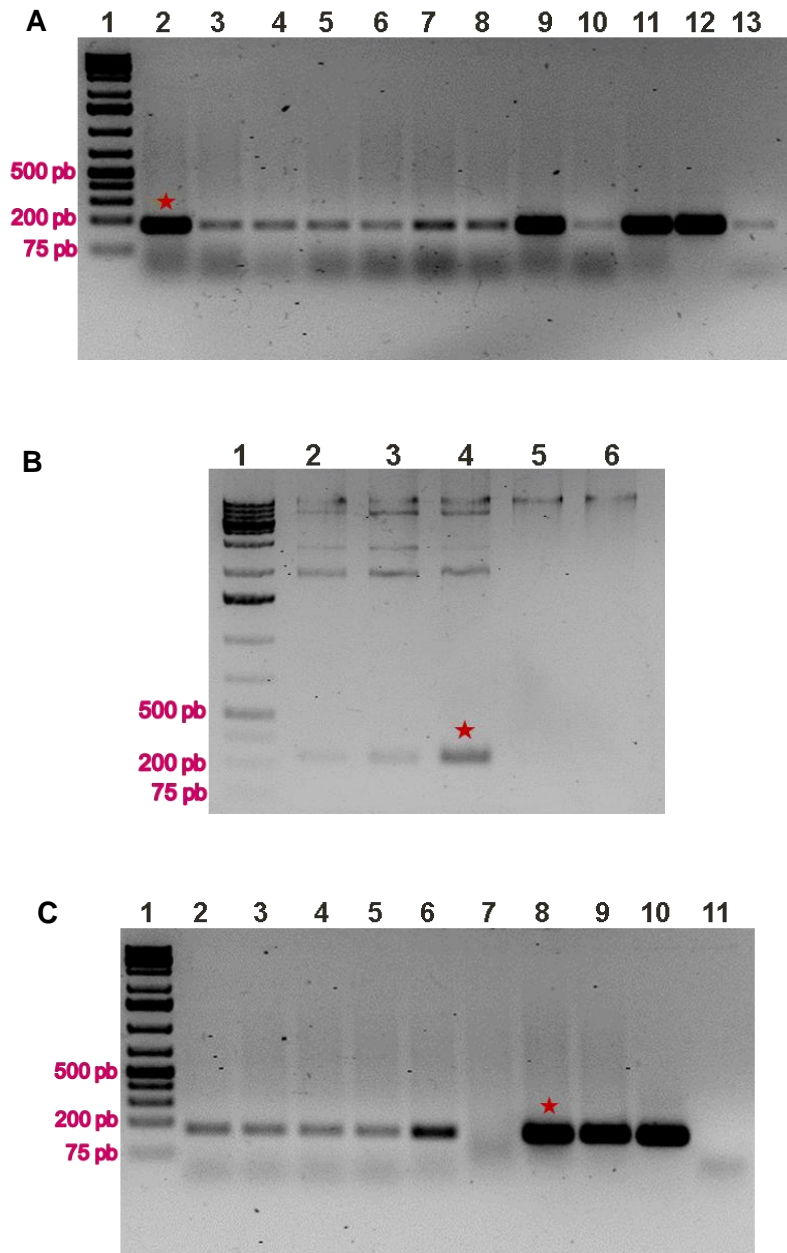


Figura 20. Análisis electroforético de los productos de PCR en colonia. Análisis de colonias producto de la reacción de la clonación del fragmento: **A**, *PvGNOM1-i*, carriles 2-11) clonas 1-10; 12), control positivo, usando fragmento *PvGNOM1-i* como templado; 13), control negativo, sin templado. **B**, *PvGNOM2-i*, carriles 2-4) clonas 1, 5 y 6; 5), control negativo, sin templado. **C**, *PvGNOM3-i*, carriles 2-9) clonas 1-6, 9 y 10; 10), control positivo, usando fragmento *PvGNOM3-i* como templado; 11), control negativo, sin templado. Los asteriscos en color rojo indican la clona que fue seleccionada para su secuenciación. Carriles 1: marcador de peso molecular, (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™, Fermentas). Se cargaron 10 μ l/pozo. Geles de agarosa al 2 %.

6.4 Recombinación de los fragmentos *PvGNOM1-i* y *PvGNOM2-i* en el vector destino pTdT-RNAi

La doble clonación de los fragmentos RNAi en el vector de expresión pTdT-RNAi (Figura 17) se realizó mediante recombinación *in vitro* utilizando el sistema Gateway® Technology (Invitrogen). La mezcla de recombinación se electroporó en *E. coli* DH5α y la identificación de clonas que portan la construcción pTdT-RNAi-*PvGNOM1-i* o pTdT-RNAi-*PvGNOM2-i* se realizó por PCR en colonia utilizando dos pares de oligonucleótidos: WRKY5 y *PvGNOM1-i* Fw (o *PvGNOM2-i* Fw según sea el caso), y WRKY3 y *PvGNOM1-i* Fw (o *PvGNOM2-i* Fw), que permiten validar la doble recombinación y orientación de los insertos (Figura 17). El tamaño esperado de los productos a amplificar con cada par de oligonucleótidos es de aproximadamente 300 y 350 pb, respectivamente. Por experiencia en nuestro grupo, se purificaron los plásmidos de las clonas identificadas como positivas y se confirmó por PCR que ambos fragmentos RNAi estuvieran en la orientación correcta en cada plásmido (Figura 21). La nomenclatura asignada a estas clonas fue pTdT-*PvGNOM1-i* C1-1 y pTdT-*PvGNOM2-i* C6-1, respectivamente. El primer número después de la letra “C” en cada construcción, corresponde al número de la clona seleccionada en la clonación en pENTR™/D-TOPO® y el segundo número a la clona producto de la recombinación en pTdT-RNAi.

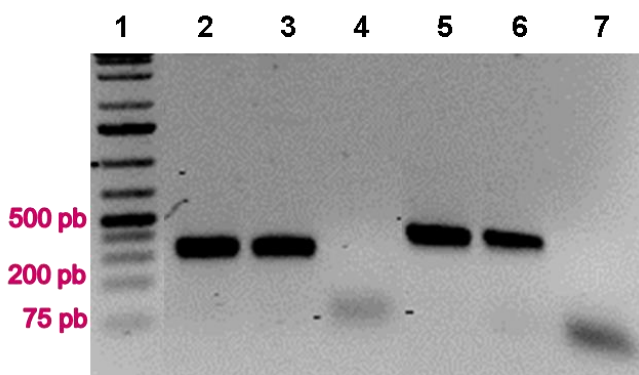


Figura 21. Análisis electroforético de los productos de PCR amplificados a partir de los plásmidos pTdT-*PvGNOM1-i* C1 y pTdT-*PvGNOM2-i* C6. Carriles 2 y 5) pTdT-*PvGNOM1-i* C1-1 y 3 y 6) pTdT-*PvGNOM2-i* C6-1. Reacción de PCR utilizando el par de oligonucleótidos: carriles 2) WRKY5 y *PvGNOM1-i* Fw; 3) WRKY5 y *PvGNOM2-i* Rv; 5) WRKY3 y *PvGNOM1-i* Fw; 6) WRKY3 y

PvGNOM2-i Fw .4 y 7) Reacciones sin templado con el par de oligonucleótidos WRKY5 y *PvGNOM2-i* Rv (4) y WRKY3 y *PvGNOM2-i* Fw (7). Carril 1: marcador de peso molecular, (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™, Fermentas). Se cargaron 10 µl/pozo. Geles de agarosa al 2 %.

No fue posible obtener la construcción pTdT-*PvGNOM3-i*, aún cuando, de manera independiente, se logró amplificar un fragmento *PvGNOM3-i* con dos pares de oligonucleótidos específicos y clonar estos fragmentos en el vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen), respectivamente. La etapa limitante fue la doble recombinación en el vector pTdT-RNAi. Si bien por PCR en colonia se identificaron clonas que portan el fragmento *PvGNOM3-i*, por secuenciación se detectan problemas de recombinación inespecífica, por lo que la caracterización fenotípica del silenciamiento de *PvGNOM3* será abordado en otro proyecto.

6.5 Identificación de las clonas de *A. rhizogenes* K599 que portan las construcciones pTdT-RNAi-*PvGNOM1-i* o pTdT-RNAi-*PvGNOM2-i* y generación de raíces transgénicas en plantas de *P. vulgaris*

Con el propósito de generar raíces transgénicas, los plásmidos pTdT-*PvGNOM1-i* C1-1 y pTdT-*PvGNOM2-i* C6-1 se electroporaron en *Agrobacterium rhizogenes* K599. Las clonas de interés fueron seleccionadas por análisis de PCR en colonia, como se describe en el inciso 6.4. La Figura 22 muestra que a partir de los extractos de cada una de las 6 clonas analizadas, se amplificó un fragmento del tamaño esperado (300 o 350 pb dependiendo de el par de oligonucleótidos utilizados), de donde todas son clonas positivas y fueron nombradas *A. rhizogenes* K599 pTdT-*PvGNOM1-i* C1-1 (clonas 1 a la 6) o pTdT-*PvGNOM2-i* C6-1 (clonas 1 a la 6).

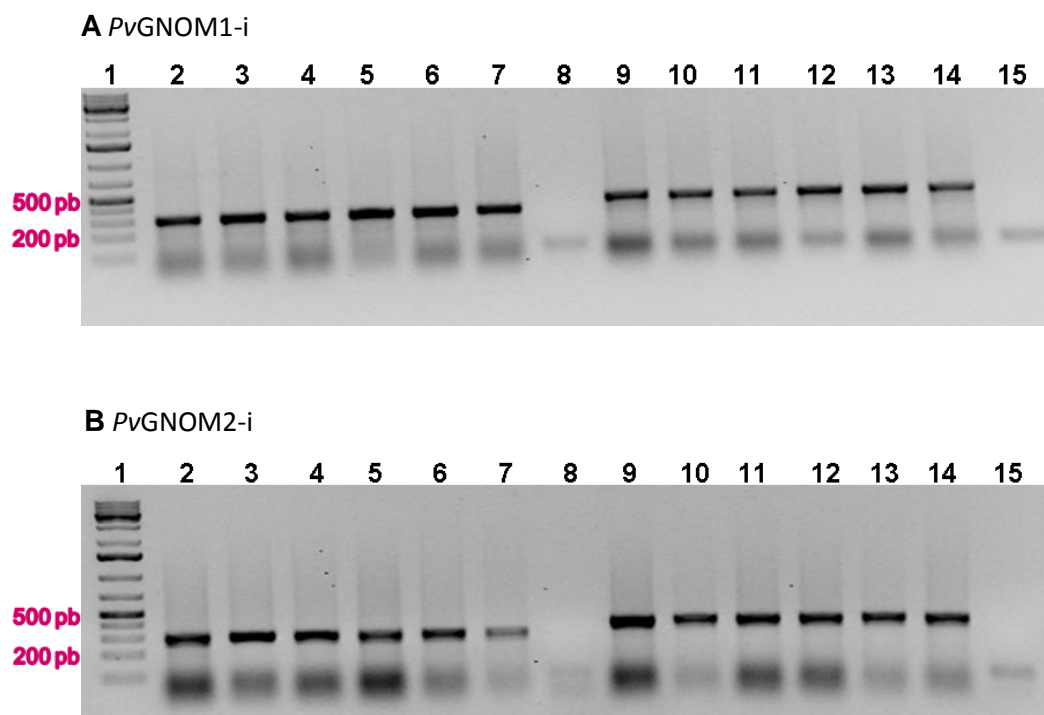


Figura 22. Análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR de las colonias de *A. rhizogenes* K599 electroporadas con: **A**, pTdT-*PvGNOM1-i* C1-1 clona 1 (carriles 2 y 9), clona 2 (carriles 3 y 10), clona 3 (carriles 4 y 11), clona 4 (carriles 5 y 12), clona 5 (carriles 6 y 13), clona 6 (carriles 7 y 14) y reacción sin templado (carriles 8 y 15). **B**, pTdT-*PvGNOM2-i* C6-1 clonas 1 a la 6 en el orden descrito en **A**. Reacciones de PCR utilizando los pares de oligonucleótidos: WRKY5 y *PvGNOM1-i* Fw (**A**, carriles del 2 al 8); WRKY3 y *PvGNOM1-i* Rv (**A**, carriles 9-15); WRKY5 y *PvGNOM2-i* Fw (**B**, carriles del 2 al 8) o WRKY3 y *PvGNOM2-i* Fw (**B**, carriles 9-15). Carriles 1, marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™, Fermentas). Se cargaron 10 µl de reacción por pozo. Geles de agarosa al 2 %.

Para identificar cuáles de las clonas de *A. rhizogenes* K599 que portan las construcciones de interés son capaces de inducir la generación de raíces transgénicas de manera reproducible y con alta eficiencia, se inocularon lotes de 6 plantas por clona de *A. rhizogenes* K599 pTdT-*PvGNOM1-i* C1-1 (clonas 1 a la 6) o *PvGNOM2-i* C6-1 (clonas 1 a la 6). De las diferentes clonas analizadas, sólo las clonas *A. rhizogenes* K599 pTdT-*PvGNOM1-i* C1-1 clonas 2 y 4, y *PvGNOM2-i* C6-1 clona 1 y 2 generaron raíces transgénicas (imagen representativa en Figura 23), con una eficiencia del 50-66 %, es decir, de las 6 plantas con raíces pilosas, 3

o 4 tenían raíces transgénicas. Como control positivo en la generación de raíces transgénicas, se utilizó una clona *A. rhizogenes* K599 pTdT-SAC que presenta una eficiencia del 100 %. Esta clona, caracterizada en el laboratorio en un estudio previo (Montiel *et al.*, 2012), porta la construcción pTdT-SAC en la que los fragmentos recombinados corresponden a una secuencia irrelevante, es decir, las raíces de *P. vulgaris* no expresan un RNA blanco. Esta clona se utiliza de manera rutinaria en estudios de silenciamiento por RNAi.

Para facilitar el seguimiento de los datos de la caracterización, a partir de este punto del texto, las raíces transgénicas serán citadas de la siguiente manera: *PvGNOM1-i* C2, *PvGNOM1-i* C4, *PvGNOM2-i* C1, *PvGNOM2-i* C2 y pTdT-SAC, respectivamente.

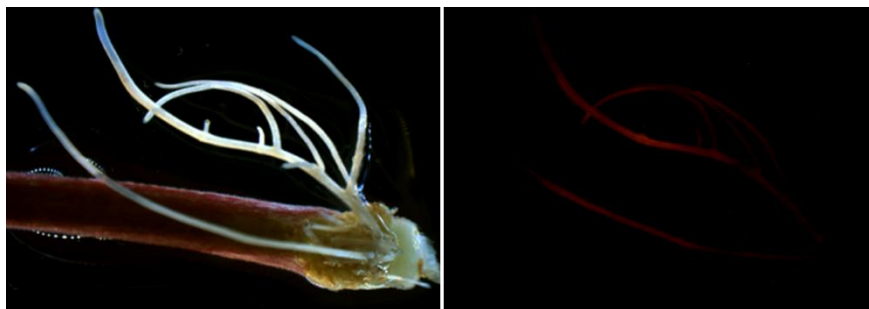


Figura 23. Micrografías representativas de una planta con raíces transgénicas (*PvGNOM1-i* C2). **A**, estereomicroscopía de campo claro y **B**, la misma raíz vista por estereomicroscopía de epifluorescencia.

6.6 Determinación de la acumulación relativa de transcrito *PvGNOM1* y *PvGNOM2* en las raíces transgénicas

Con el propósito de determinar el nivel de silenciamiento de los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2* en las raíces transgénicas, el RNA total extraído de tres plantas individuales por clona (réplicas biológicas) fue analizado por RT-qPCR utilizando el par de oligonucleótidos gene-específicos (ver Tabla 1), utilizando 50 ng de cDNA de raíces transgénicas por reacción. La figura 24 representa los resultados

obtenidos. Se observó que con respecto a los valores de acumulación relativa en las raíces transgénicas control pTdT-SAC, las raíces transgénicas *PvGNOM1-i C2* y *PvGNOM1-i C4* presentaron una reducción en la acumulación relativa del transcrito *PvGNOM1* de aproximadamente 70 y 52 %, respectivamente, mientras que en las raíces transgénicas *PvGNOM2-i C1* y *PvGNOM2-i C2*, la reducción del nivel de transcrito *PvGNOM2* acumulado fue de aproximadamente del 63 y 68 %, respectivamente.

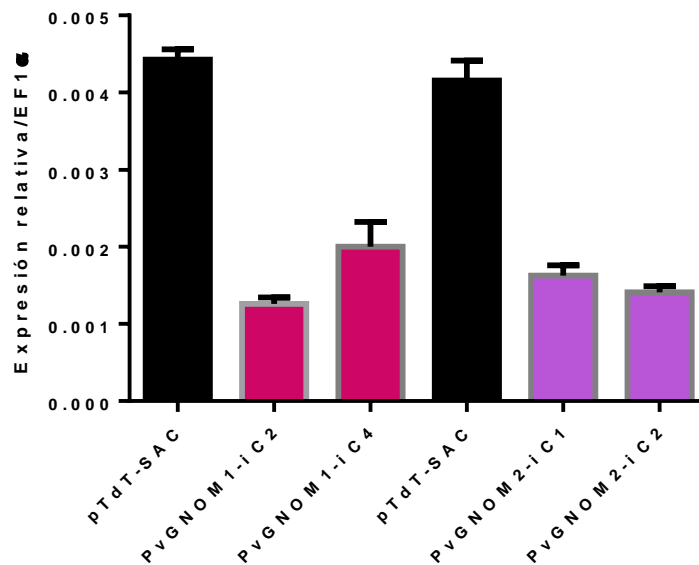


Figura 24. Análisis de la acumulación relativa de transcritos *PvGNOM1* y *PvGNOM2* en raíces transgénicas *PvGNOM1-i C2* y *PvGNOM1-i C4* (barras rosas) y *PvGNOM2-i C1* y *PvGNOM2-i C2* (barras moradas). El nivel de acumulación de transcrito en muestras de RNA total de raíces transgénicas de tres plantas individuales (réplicas biológicas) fue determinado por RT-qPCR (ensayos por triplicado) usando el par de oligonucleótidos transcrito-específico. Como referencia para el cálculo de la acumulación relativa de transcrito se utilizaron los valores del transcrito del Factor de Elongación 1 alfa ($EF1\alpha$). Se graficó el valor promedio de las réplicas biológicas. Barra: error estándar.

Para explorar si el silenciamiento en la expresión de los genes *PvGNOM1* o *PvGNOM2* altera la acumulación relativa del transcrito de los otros genes *PvGNOM*, se realizaron ensayos de RT-qPCR con los pares de oligonucleótidos correspondientes. Los resultados (Figura 25A) muestran que en las raíces

transgénicas *PvGNOM1-i* C2 y *PvGNOM1-i* C4, la acumulación relativa del transcrito *PvGNOM2* es equivalente al 99 y 106 %, respectivamente, del valor obtenido en las raíces transgénicas control pTdt-SAC. Mientras que el nivel de acumulación relativa del transcrito *PvGNOM3* es de 124 y 111 %, respectivamente (Figura 25B). En el caso de las raíces transgénicas *PvGNOM2-i* C1 y *PvGNOM2-i* C2, los valores de acumulación relativa de transcrito *PvGNOM1* fueron de 99 y 87 %, respectivamente (Figura 25C), y del transcrito *PvGNOM3* de 126 y 82 %, respectivamente (Figura 25D). Esto indica que el silenciamiento de los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2* es gene-específico.

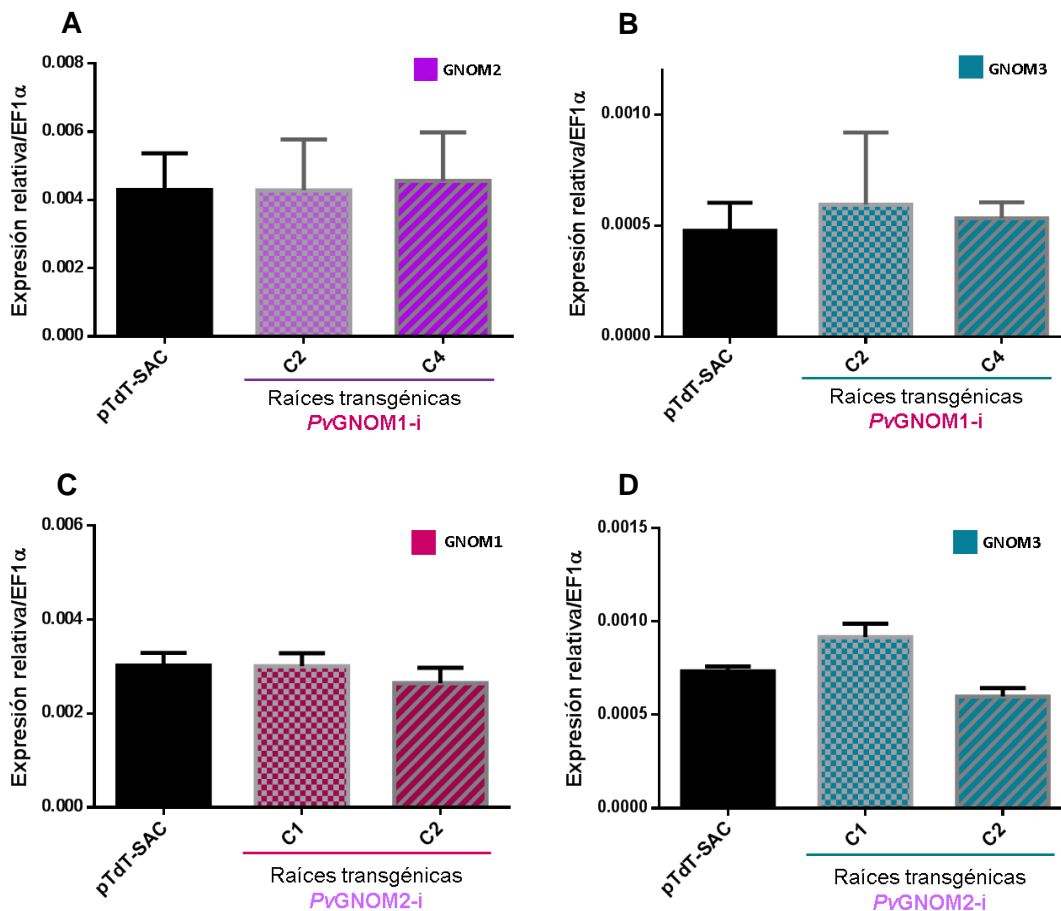


Figura 25. Análisis de la acumulación relativa de transcritos *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3* en las muestras de raíces transgénicas *PvGNOM1-i* (A y B) y *PvGNOM2-i* (C y D) analizadas en la Figura 24. El análisis por RT-qPCR (ensayos por triplicado) se realizó utilizando el par de oligonucleótidos transcrito-específicos. Como referencia para el cálculo de la acumulación relativa de transcrito se utilizaron los valores del transcrito del Factor de Elongación 1 alfa (EF1 α). Se graficó el valor promedio de las réplicas biológicas. Barra: error estándar.

6.7 Análisis del fenotipo de las raíces transgénicas silenciadas en los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2*

6.7.1 Efecto del silenciamiento en el fenotipo de nodulación

Como primera etapa en el análisis fenotípico del silenciamiento en la nodulación, se determinó el número y el diámetro de los nódulos generados en las raíces transgénicas, inoculadas con una cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899, que expresa la enzima β -glucuronidasa (GUS). La tinción histoquímica por actividad de GUS permite la rápida identificación de los nódulos infectados, así como el conteo y determinación del diámetro de los nódulos.

En general, los nódulos que se observan en las raíces de *P. vulgaris* tipo silvestre a los 7 días post-inoculación (dpi) son pequeños y contienen pocas células infectadas. A los 14 dpi, si bien aún no todas las células del tejido central están infectadas, los nódulos presentan una baja actividad de fijación de nitrógeno. Los nódulos de 21 dpi son maduros, alcanzan su máximo nivel de infección y de fijación de nitrógeno y han llegado a su tamaño máximo.

En la Figura 26 se presentan los resultados de 2 series de experimentos independientes en los que se contó y determinó el diámetro de los nódulos generados en las raíces transgénicas. Cada serie comprende el análisis de dos lotes independientes (réplicas biológicas) de raíces transgénicas (5 plantas por lote) por tiempo de cosecha post-inoculación (7, 14 y 21 dpi).

En una serie se evaluó el fenotipo de nodulación en las raíces transgénicas silenciadas en la expresión del gen *PvGNOM1* y el control pTdT-SAC correspondiente. La segunda serie corresponde al análisis fenotípico en las raíces transgénicas *PvGNOM2-i* C1 y *PvGNOM2-i* C4, y control *PvTdT-SAC*. Los resultados se recapitulan en la Tabla 2. Se encontró que el número de nódulos por planta tiende a ser mayor en las raíces silenciadas que en las raíces control. A los 21 dpi, en la serie de las raíces transgénicas *PvGNOM1-i* C2 y *PvGNOM1-i* C4, se generaron 77.0 ± 15.38 y 73.90 ± 17.78 nódulos por planta (\pm error estándar o EE), respectivamente, mientras que en las raíces transgénicas control (pTdT-SAC) se encontraron 47.11 ± 7.9 nódulos por planta. La diferencia en el número de

nódulos respecto a las raíces transgénicas control fue aún mas acentuada al silenciar el gen *PvGNOM2*. El número de nódulos por planta en las raíces transgénicas *PvGNOM2-i C1* y *PvGNOM2-i C2* fue de 94.4 ± 17.0 y 108.7 ± 15 , respectivamente, *versus* 36.77 ± 4.95 en las raíces transgénicas control. Otro parámetro de comparación que se evaluó en estas muestras fue el diámetro de los nódulos (Figura 26 y Tabla 2). Los resultados fueron graficados utilizando el método de diagrama de caja (cajas y bigotes, opción "Min to max"), donde los extremos de los bigotes marcan el valor de diámetro mínimo y máximo. Los valores del 50 % de la población están enmarcados por un rectángulo o caja. Las barras verticales (bigotes) inferior y superior corresponden a los valores en el resto de la población (25 % en cada barra). La mediana de los valores de diámetro está indicada por la línea horizontal que cruza la caja. Aún cuando a simple vista parece no haber diferencia entre el diámetro de los nódulos generados en las raíces silenciadas y las raíces control, la prueba estadística Welch mostró diferencias significativas entre algunas de las muestras (Figura 26). La prueba Welch es no paramétrica, tipo *t*-student, para análisis de datos de dos muestras que presentan diferentes valores de varianza y tamaño de muestra, no importando si la distribución de los valores es asimétrica. En esta prueba los valores de probabilidad, $p < 0.05$ son significativos (página web <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=C>).

En este análisis fenotípico, se encontró que a los 7 dpi, si bien el diámetro promedio \pm DE (desviación estándar) de los nódulos de las raíces transgénicas *PvGNOM1-i C2* y *pTdT-SAC* es similar (0.537 ± 0.121 y 0.511 ± 0.114 , respectivamente), sólo los nódulos de las raíces transgénicas *PvGNOM1-i C4* presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a los nódulos generados en las raíces transgénicas control *pTdT-SAC* (Figura 26A).

La distribución del diámetro de los nódulos cosechados a los 14 dpi a partir de las raíces transgénicas de ambas clonas *PvGNOM1-i* mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$ y < 0.0001 , respectivamente) en

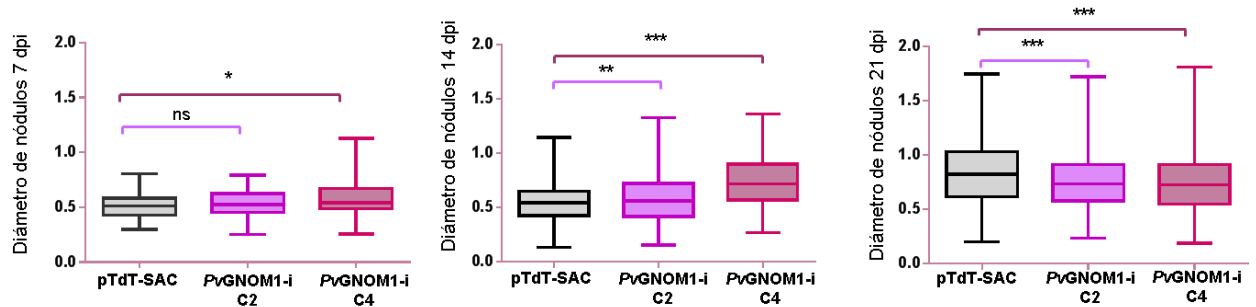
comparación con los nódulos en las raíces control (Figura 26A). Si bien la diferencia no es muy grande, el diámetro promedio de los nódulos tiende a ser mayor en las raíces silenciadas. En este caso, el 50 % de los nódulos presentaron un rango de diámetro entre 0.385-0.715 y 0.587-0.897 mm (*PvGNOM1-i C2* y *PvGNOM1-i C4*, respectivamente), mientras que los nódulos de las raíces transgénicas control el rango fue de 0.414-0.643 mm. Los valores de diámetro promedio (\pm DE) fueron de 0.585 ± 0.214 (*PvGNOM1-i C2*), 0.734 ± 0.215 (*PvGNOM1-i C4*) y 0.551 ± 0.180 , (pTdT-SAC). Los valores correspondientes al máximo de diámetro de cada muestra fue de 1.33, 1.36 y 1.14 mm, respectivamente.

A los 21 dpi, los nódulos de las raíces *PvGNOM1-i C2* y *PvGNOM1-i C4* presentaron una diferencia muy significativa ($p < 0.0001$) con respecto a los nódulos control (Figura 26A). Los valores promedio \pm DE correspondientes fueron 0.752 ± 0.245 y 0.750 ± 0.280 mm, respectivamente, en tanto que en los nódulos de las raíces control el valor fue superior (0.834 ± 0.304 mm). Igualmente, el rango de diámetro del 50 % de los nódulos en raíces control está un poco desplazado hacia valores mayores que en el caso de las raíces transgénica silenciadas, sin embargo los valores máximos de diámetro son muy similares entre los 3 grupos de raíces (Tabla 2).

Respecto a los nódulos de las raíces transgénicas silenciadas en *PvGNOM2* (Figura 26B), sólo en las raíces *PvGNOM2-i C2* se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) a los 14 y 21 dpi, relativa al diámetro de los nódulos correspondientes en las raíces transgénicas control (pTdT-SAC). Los valores de diámetro promedio (\pm DE) de los nódulos generados en las raíces transgénicas *PvGNOM2-i C1*, *PvGNOM2-i C2* y pTdT-SAC a los 7 dpi fueron 0.484 ± 0.120 , 0.503 ± 0.120 y 0.512 ± 0.130 mm, respectivamente. En los tres grupos de raíces, el rango de diámetro del 50 % de los nódulos y el valor máximo de diámetro son similares (Tabla 2). A los 14 dpi, estos valores corresponden a 0.729 ± 0.270 , 0.758 ± 0.270 , 0.669 ± 0.216 , respectivamente, mientras que a los

21 dpi fueron 0.779 ± 0.271 , 0.767 ± 0.224 y 0.812 ± 0.291 , respectivamente, sin que se observara diferencia en los valores de rango de diámetro del 50% de los nódulos, ni en el valor máximo de diámetro (Tabla 2).

A *PvGNOM1-i C2* y *PvGNOM1-i C4*



B *PvGNOM2-i C1* y *PvGNOM2-i C2*

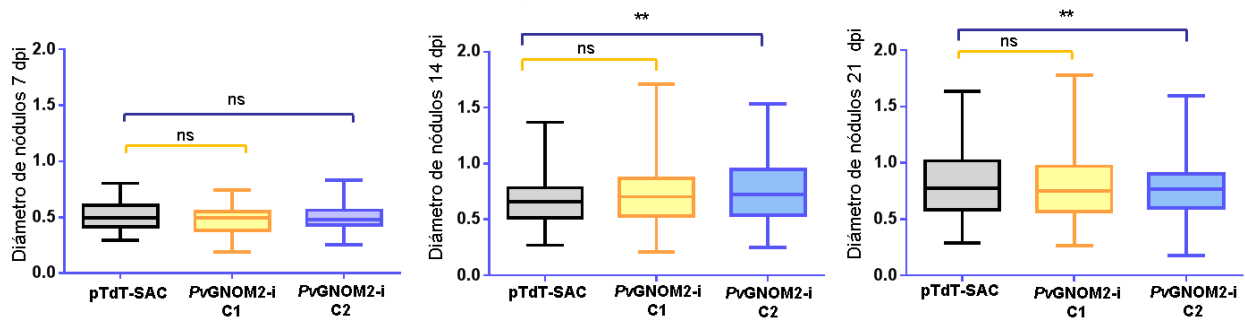


Figura 26. Distribución del diámetro de nódulos en raíces transgénicas silenciadas. Nódulos cosechados los 7, 14 y 21 días post-inoculación (dpi) con *R. tropici* CIAT899-GUS a partir de las raíces transgénicas **pTdT-SAC**, ***PvGNOM1-i C2*** y ***PvGNOM1-i C4*** (A); **pTdT-SAC**, ***PvGNOM2-i C1*** y ***PvGNOM2-i C2*** (B). Los datos numéricos se recapitulan en la tabla 2. Valores de probabilidad con la prueba estadística Welch, no paramétrica, tipo *t* –student: $p > 0.05$ es no significativo (ns); (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

Tabla 2. Mediciones del número y del diámetro de los nódulos de las raíces transgénicas **PvGNOM1-i C2** y **PvGNOM1-i C4**, **PvGNOM2-i C1** y **PvGNOM2-i C2** y **pTdT-SAC** cosechados a los 7, 14 y 21 dpi.

A Raíces transgénicas 7 dpi

Raíz transgénica	Número total de nódulos	Nódulos por planta	Diámetro (mm) de 50% de los nódulos	Mediana del diámetro de nódulos	Diámetro menor	Diámetro mayor	Promedio de diámetro de nódulo±DE (mm)
PvGNOM1-i C2	58	7.7±2.0	0.435-0.588	0.526	0.253	0.792	0.537±0.121
PvGNOM1-i C4	51	6.25±2.15	0.485-0.634	0.541	0.257	1.127	0.583±0.167
pTdT-SAC	52	4±0.9	0.423-0.569	0.5115	0.297	0.804	0.511±0.114
PvGNOM2-i C1	73	7.3±2.3	0.382-0.549	0.493	0.193	0.833	0.48419±0.120
PvGNOM2-i C2	125	15.5±4	0.429-0.561	0.477	0.257	0.74	0.503±0.120
pTdT-SAC	75	6.9±2.2	0.414-0.596	0.497	0.297	0.804	0.512±0.130

B Raíces transgénicas 14 dpi

Raíz transgénica	Número total de nódulos	Nódulos por planta	Diámetro (mm) de 50% de los nódulos	Mediana del diámetro de nódulos	Diámetro menor	Diámetro mayor	Promedio de diámetro de nódulo±DE (mm)
PvGNOM1-i C2	575	57.5±12.5	0.385-0.715	0.56	0.15	1.327	0.585±0.214
PvGNOM1-i C4	282	26.6±7.99	0.587-0.897	0.718	0.266	1.36	0.734±0.215
pTdT-SAC	406	47.44±10.32	.414-0.643	0.5415	0.133	1.143	0.551±0.180
PvGNOM2-i C1	199	20±5.3	0.526-0.854	0.704	0.387	1.709	0.729±0.270
PvGNOM2-i C2	353	39.2±5.3	0.540-0.935	0.725	0.265	1.535	0.758±0.270
pTdT-SAC	89	9.88±1.4	0.514-0.766	0.658	0.33	1.369	0.669±0.216

C Raíces transgénicas 21 dpi

Raíz transgénica	Número total de nódulos	Nódulos por planta	Diámetro (mm) de 50% de los nódulos	Mediana del diámetro de nódulos	Diámetro menor	Diámetro mayor	Promedio de diámetro de nódulo±DE (mm)
PvGNOM1-i C2	767	77±15.38	0.576-0.911	0.7315	0.225	1.719	0.752±0.245
PvGNOM1-i C4	617	73.90±17.78	0.546-0.910	0.726	0.184	1.811	0.750±0.280
pTdT-SAC	416	47.11±7.9	0.616-1.029	0.807	0.128	1.748	0.834±0.304
PvGNOM2-i C1	1037	94.4±17.0	0.567-0.966	0.753	0.264	1.777	0.779±0.271
PvGNOM2-i C2	1120	108.7±15	0.599-0.966	0.7685	0.177	1.597	0.767±0.224
pTdT-SAC	331	36.77±4.95	0.583-1.007	0.773	0.288	1.638	0.812±0.291

6.7.2 Evaluación de la endocitosis en raíces de *P. vulgaris* tipo silvestre (3 dpj) mediante la internalización del marcador FM1-43

Con el objetivo de establecer las condiciones para visualizar la endocitosis en células de raíz de frijol, se realizó una cinética de marcaje e internalización del reactivo lipofílico fluorescente FM1-43 (un marcador *bona fide* de endocitosis) en pelos radicales de plántulas de *P. vulgaris* tipo silvestre. Los pelos radicales pre-incubados con FM1-43 (6.6 ng/μl) son monitoreados por microscopía de epifluorescencia *in vivo* durante 30 minutos, con captura de imágenes de la parte apical del pelo radical cada 10 segundos. La gráfica de los niveles de fluorescencia en un área circular de la zona apical (representada por un círculo rojo en la Figura 26) mostró que al inicio la fluorescencia de FM1-43 está asociada, mayoritariamente, a la MP del ápice del pelo radical (Figura 27). Subsecuentemente, la señal fluorescente se internalizó paulatinamente (6 minutos); aproximadamente a los 19 minutos se observa un máximo de fluorescencia del marcador FM1-43 distribuido en el citoplasma del pelo radical con un patrón punteado.

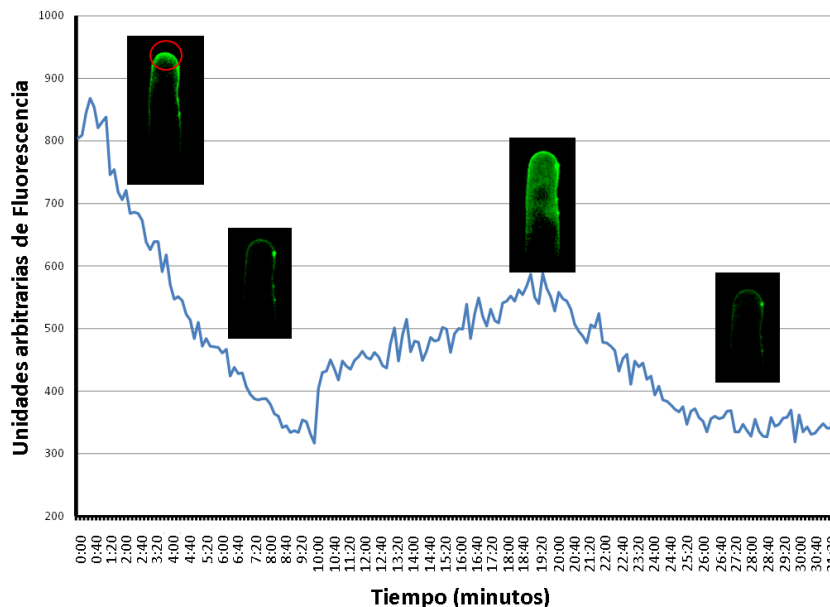


Figura 27. Niveles de fluorescencia en el ápice de un pelo radical de plántulas de *P. vulgaris* tipo silvestre. Se capturaron imágenes de un pelo radical en crecimiento, pre-incubado con el marcador lipofílico FM1-43 (6.6 ng/μl). La cinética de internalización es observada por microscopía de

epifluorescencia *in vivo* durante 30 minutos, con captura de imágenes cada 10 segundos. Los valores absolutos (en unidades arbitrarias) de fluorescencia graficados en función del tiempo de incubación con el marcador de endocitosis FM1-43 corresponden al área circular (círculo rojo) del ápice del pelo radical. Los datos de fluorescencia son determinados utilizando el software MetaMorph®. La gráfica es representativa de dos pelos radicales.

La segunda etapa fue definir las condiciones de incubación en presencia del inhibidor fúngico de el transporte vesicular BFA, con el propósito de evaluar la inhibición de la internalización y la distribución subcelular de FM1-43 en pelos radicales de *P. vulgaris* tipo silvestre. La Figura 28 presenta los resultados obtenidos en pelos radicales pre-incubados con la BFA (20, 50 o 100 μM) durante 30 minutos y después marcados con FM1-43. La internalización de FM1-43, es monitoreada como se describe en la Figura 27. Las imágenes capturadas demostraron que la pre-incubación con BFA, independientemente de la concentración probada, no tiene efecto en la incorporación de FM1-43 a la MP de los pelos radicales. Pero sí mostró efecto inhibitorio sobre la internalización de este marcador fluorescente. Dado que la inhibición de BFA es dosis-dependiente, se hizo una cinética en pelos radicales pre-incubados con BFA a 20, 50 y 100 μM . En los pelos radicales pre-incubados con BFA a 20 μM se detecta menor intensidad de fluorescencia en el citoplasma, es decir, disminuye la internalización de FM1-43 con respecto a lo observado en los pelos radicales control (sin tratamiento con BFA). En cambio, los niveles de fluorescencia en el citoplasma son apenas detectables en las células pre-incubadas con 50 y 100 μM .

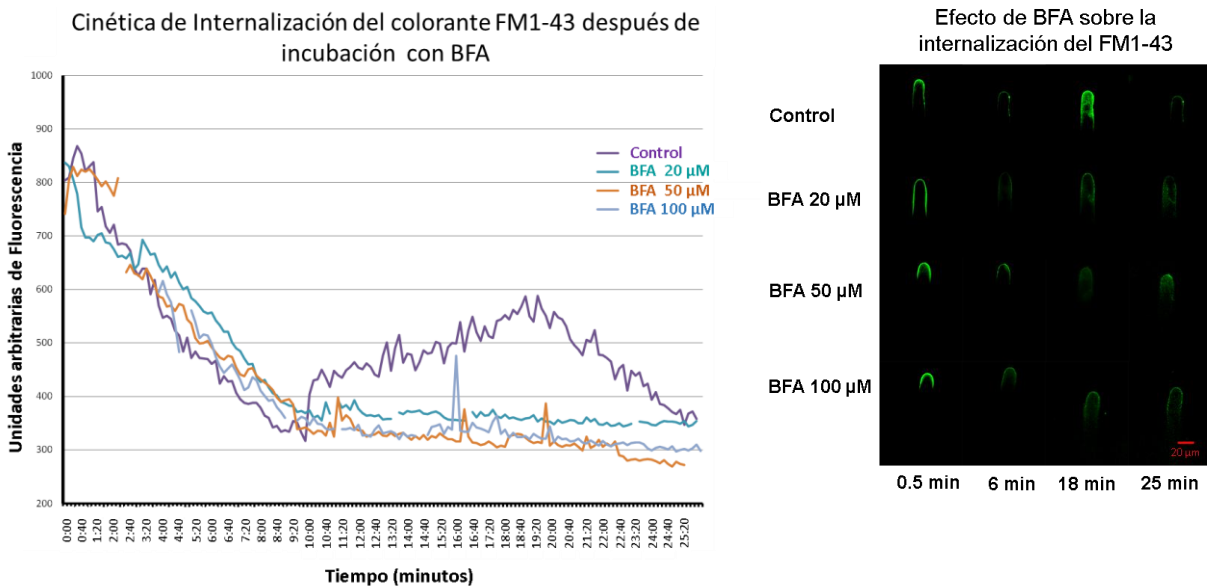


Figura 28. Inhibición de la internalización de FM1-43 en pelos radicales de plántulas de *P. vulgaris* tipo silvestre pre-incubados con BFA. Pelos radicales de *P. vulgaris* pre-incubados con BFA (20, 50 o 100 μM) durante 30 minutos fueron marcados con FM1-43 (6,6 ng/μL) y monitoreados por microscopía de epifluorescencia *in vivo* durante 25 minutos, como se describe al pie de la Figura 27. La gráfica es representativa de dos pelos radicales por concentración de BFA.

6.7.3 Visualización del marcador FM1-43 en células corticales de las raíces transgénicas silenciadas

Al intentar monitorear la internalización de FM1-43 en pelos radicales de las raíces transgénicas, se encontró una incompatibilidad entre la distancia focal de los objetivos del microscopio de epifluorescencia utilizado en los análisis anteriores y el grosor de las raíces transgénicas. La alternativa explorada fue el uso del microscopio confocal invertido de disco giratorio (Zeiss Observer Z.1) del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, ubicado en el Instituto de Biotecnología-UNAM. Dada las características de la platina de este microscopio fue necesario hacer algunas modificaciones para poder observar *in vivo* las raíces transgénicas (ver Anexo 5). Para los experimentos de monitoreo de internalización de FM1-4, las plantas cuyas raíces transgénicas tienen entre 2-3 cm de largo son

colocadas en una caja Petri modificada con medio Färhaeus y se cubren con papel celofán dulce. Ya que el montaje ocasiona estrés a la raíz, las plantas montadas se dejaron en recuperación durante 24 hrs a 28 °C, para posteriormente marcar las raíces con FM1-43 y observarlas al microscopio confocal invertido de disco giratorio.

Cabe mencionar, que si bien uno de los objetivos de este proyecto era analizar la endocitosis de FM1-43 en los pelos radicales, al analizar las raíces transgénicas se observó que la formación y crecimiento de los pelos radicales estaba inhibida, probablemente por el estrés ocasionado por la manipulación al montar las raíces transgénicas en las cajas Petri. Por lo que, se decidió estudiar el fenotipo de internalización del marcador de endocitosis FM1-43 en las células del córtex externo de las raíces transgénicas. En las Figuras 29 y 30, se muestran micrografías, en columna de dos, representativas de las células del córtex externo de las raíces transgénicas marcadas durante 60 minutos FM1-43 (6,6 ng/μl).

En las células corticales de las raíces transgénicas pTdT-SAC (Figuras 29 y 30, panel A), el marcador fluorescente FM1-43 presenta una distribución homogénea en la MP y un patrón intracelular, punteado, característico de una distribución tipo vesicular que indica la internalización (endocitosis) del marcador FM1-43. En las imágenes representativas de las células del córtex de las raíces transgénicas PvGNOM1-i C4 (Figura 29, panel B), además del marcaje de la MP, en ocasiones muy intenso, se observa que hay cúmulos de fluorescencia al interior de las células corticales, es decir, hay internalización de FM1-43 pero con una distribución en forma de parches de fluorescencia, grandes, de forma esférica, que se parecen a las imágenes de los compartimentos tipo BFA (Lam *et al.*, 2009). El panel C de la Figura 29 muestra que en las células corticales de las raíces transgénicas PvGNOM1-i C2, si bien el marcador FM1-43 se intercala en la MP, no hay fluorescencia en el entorno intracelular, lo que sugiere que la actividad de endocitosis está disminuída o inhibida en las células de estas raíces.

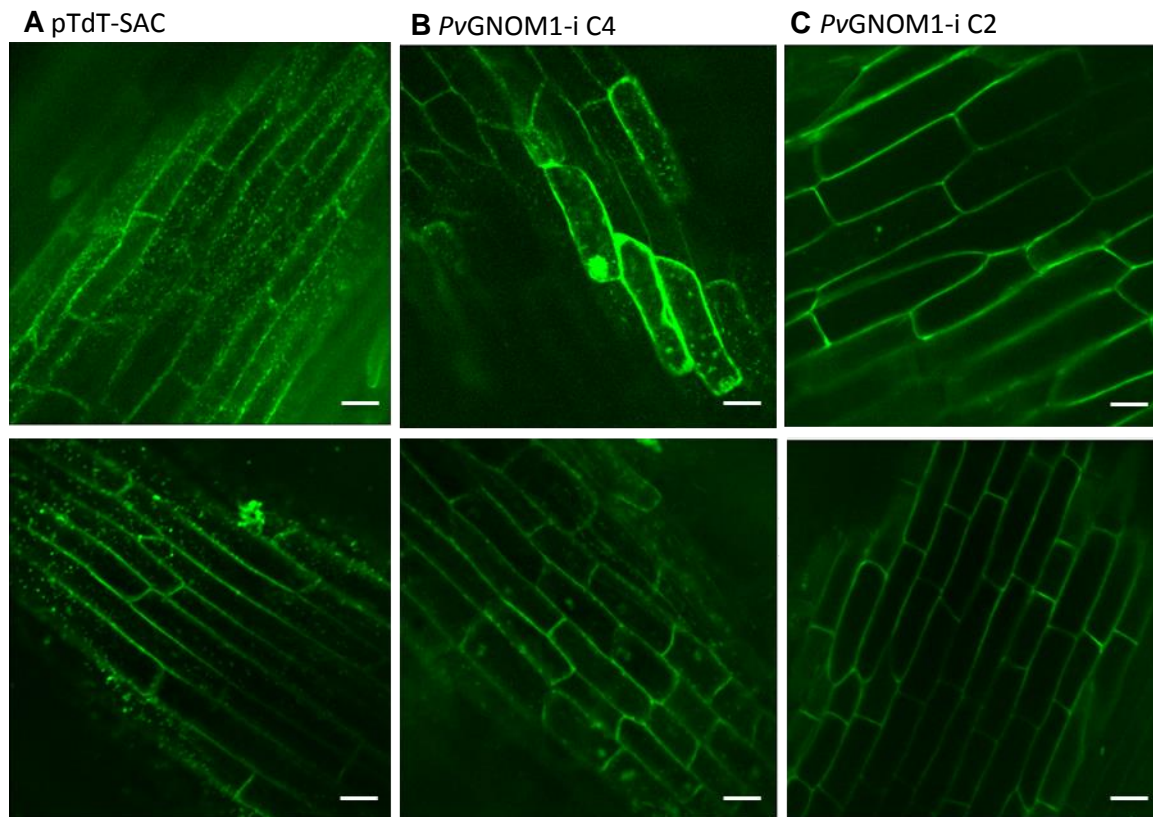


Figura 29. Micrografías de las células del córtex externo de las raíces transgénicas (pTdT-SAC, *PvGNOM1-i C4* y *PvGNOM1-i C2*) que ilustran la distribución subcelular del marcador de endocitosis FM1-43. **A**, Raíces transgénicas control (pTdT-SAC). **B**, Raíces transgénicas de *PvGNOM1-i C4*. **C**, Raíces transgénicas de *PvGNOM1-i C2*. Se incluyen dos micrografías en columna, representativas de 2 raíces transgénicas independientes. Imágenes capturadas en el microscopio confocal invertido de disco giratorio (Zeiss Observer Z.1) del LNMA en el Instituto de Biotecnología-UNAM, a los 60 minutos después de la incubación con FM1-43. La barra representa 50 μm .

En las células corticales de las raíces transgénicas *PvGNOM2-i C1*, el marcaje de la MP con FM1-43 es menos intenso que en las células de las otras raíces transgénicas, pero en el entorno intracelular la fluorescencia se observa asociada a grandes cúmulos (Figura 30, panel B), que ocupan un área aparentemente mayor que la observada en las células de las raíces transgénicas *PvGNOM1-i C4* (Figura 29, panel B). Las imágenes sugieren que en las raíces transgénicas

PvGNOM2-i C1 el fenotipo de compartimentos tipo BFA es más acentuado. En el caso de las células corticales de raíces transgénicas *PvGNOM2-i C2*, la distribución de FM1-43 es similar a la observada en células *PvGNOM1-i C2*, es decir, principalmente asociado a la MP, sin evidencia de internalización (Figura 30, panel C).

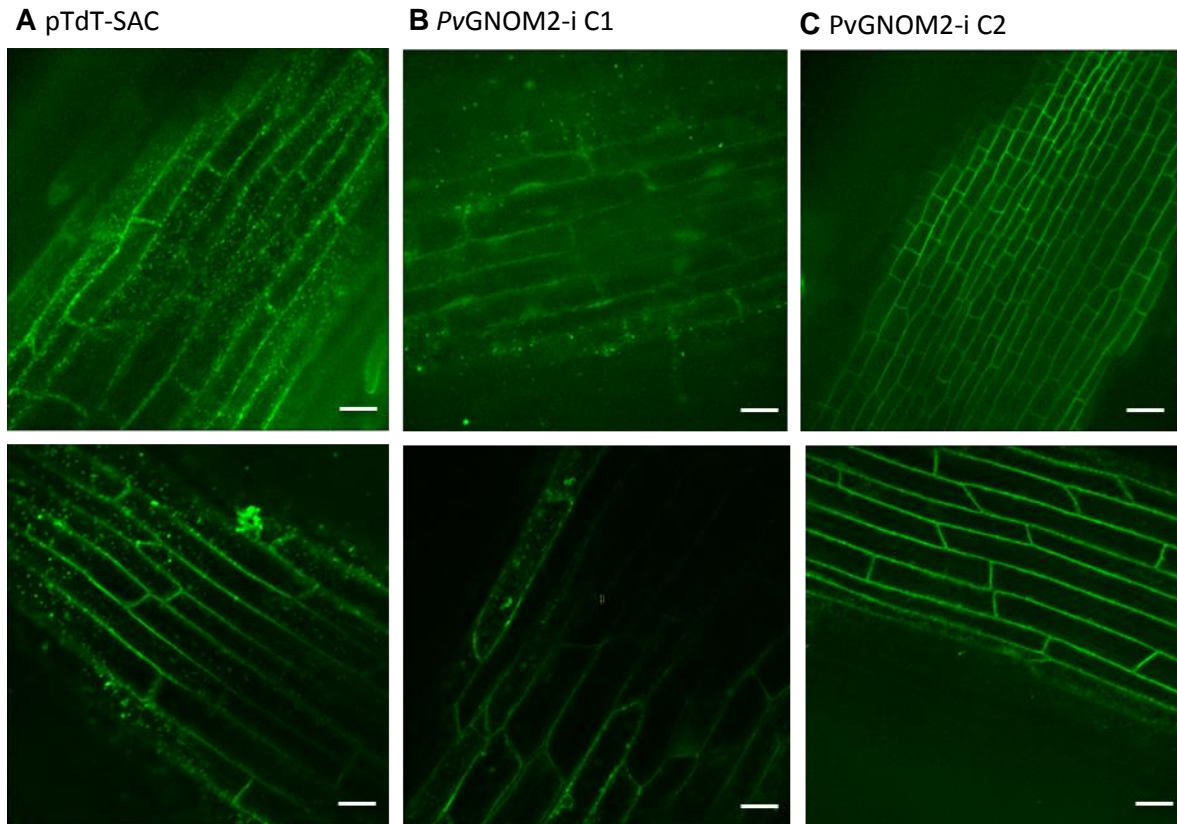


Figura 30. Micrografías de las células del córtex externo de las raíces transgénicas (*pTdT-SAC*, *PvGNOM2-i C1* y *PvGNOM2-i C2*) que ilustran la distribución subcelular del marcador de endocitosis FM1-43. **A**, Raíces transgénicas control (*pTdT-SAC*). **B**, Raíces transgénicas de *PvGNOM2-i C1*. **C**, Raíces transgénicas de *PvGNOM2-i C2*. Se incluyen dos micrografías en columna, representativas de 2 raíces transgénicas independientes. Imágenes capturadas en el microscopio confocal invertido de disco giratorio (Zeiss Observer Z.1) del LNMA en el Instituto de Biotecnología-UNAM, a los 60 minutos después de la incubación con FM1-43. La barra representa 50 μm .

Con el propósito de comparar el patrón de acumulación de FM1-43 en las raíces transgénicas silenciadas *versus* la distribución de este marcador en raíces tratadas con la BFA, las raíces transgénicas pTdT-SAC fueron pre-incubadas con la BFA (100 μ M) durante 30 minutos para después agregar el marcador FM1-43 y monitorear la distribución subcelular de la fluorescencia en función del tiempo (Figura 31). En vez de observarse el marcaje de la MP y el típico patrón de fluorescencia punteado en el entorno citoplasmático observado en las células de las raíces transgénicas pTdT-SAC (Figura 31, panel A), en las raíces transgénicas pTdT-SAC tratadas con la BFA, no se detecta fluorescencia asociada a la MP. La fluorescencia está concentrada en cúmulos intracelulares, similares a los descritos como compartimentos BFA (Figura 31, panel B). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que en las raíces transgénicas *PvGNOM1-i C4* y *PvGNOM2-i C2* se forman compartimientos tipo BFA, es decir, se fenocopia el efecto de BFA.

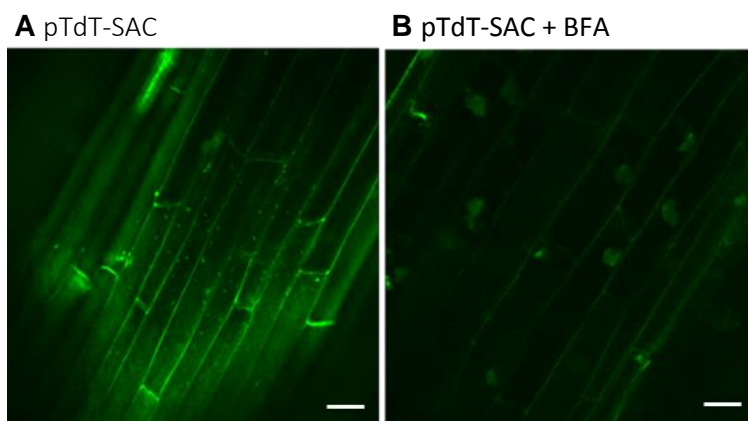


Figura 31. Efecto de BFA en la distribución subcelular del marcador de endocitosis FM1-43 en células corticales de las raíces transgénicas control (pTdT-SAC). **A**, Raíces transgénicas sin tratamiento (pTdT-SAC) o **B**, pre-incubadas con BFA (100 μ M) durante 30 minutos (pTdT-SAC + BFA) y luego marcadas durante 60 minutos con FM1-43. Imágenes capturadas en el microscopio confocal invertido de disco giratorio (Zeiss Observer Z.1) del LNMA en el Instituto de Biotecnología-UNAM, a los 60 minutos después de la incubación con FM1-43. La barra representa 50 μ m.

7. DISCUSIÓN

En eucariotes, el transporte intracelular de membranas es esencial en procesos celulares como la exocitosis, la endocitosis, el reciclaje endosomal, la señalización, el funcionamiento de organelos, el crecimiento celular, entre otros, lo que en su conjunto implica una óptima actividad celular (Jaillais *et al.*, 2007). En plantas estos procesos son importantes tanto para el desarrollo, como para su interacción con el medio ambiente, defensa contra patógenos y asociación con microorganismos simbióticos, por citar algunos ejemplos.

La asociación simbiótica leguminosa-rizobia da inicio en los pelos radicales, el sitio de entrada de la bacteria. Los pelos radicales son el resultado de la diferenciación y elongación de algunas células epidermales de la raíz que se extienden hacia la rizósfera. En las plantas, los pelos radicales y tubos polínicos son células modelo para el análisis del crecimiento polarizado tipo “tip-growth” (Richter *et al.*, 2012). Este tipo de crecimiento polar involucra una alta coordinación de respuestas celulares como son el aumento en los niveles intracelulares de calcio, el rearreglo del citoesqueleto, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros, así como procesos de síntesis, liberación y reciclaje del material de membrana y pared celular, en los que se ha demostrado que el transporte vesicular tiene un papel fundamental (Mendrinna y Persson, 2015). El estudio de estos modelos celulares ha evidenciado que la regulación de las actividades endocíticas y de reciclaje endosomal tienen un papel fundamental en el crecimiento apical (Campanoni y Blatt, 2007).

Se sabe que en *A. thaliana*, el crecimiento celular polarizado requiere de la participación del reciclaje endosomal mediado por factores de intercambio de las GTPasas de la subfamilia ARF, puntualmente la proteína ARF-GEF con un dominio catalítico Sec7, conocida como GNOM (Richter *et al.*, 2012). Trece de los 24 alelos *gnom* portan mutaciones sin sentido antes o dentro del dominio central catalítico Sec7 (Figura 12 y Anexo 1). La pérdida de función del gen *GNOM* en *A. thaliana* desencadena graves defectos en la alineación célula-célula y en el

establecimiento de la polaridad apical-basal del eje embrionario (Richter *et al.*, 2012). Las plantas de *A. thaliana* con mutaciones en el gen homólogo a *AtGNOM*, mutantes *gnl1*, son viables y fértiles, con un fenotipo descrito como planta tipo arbusto (“bush-plant”; Richter *et al.*, 2007). Por otro lado, se sabe que el gen *AtGNOM*, así como los genes *AtGNL2* y *NtGNL1* tienen un papel esencial en el crecimiento polar de los pelos radicales y del tubo polínico, respectivamente (Richter *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2009; Fanglei *et al.*, 2010).

La caracterización funcional de las proteínas *AtGNOM* y *AtPIN1* (transportador de auxinas) evidenció el papel de *GNOM* en el reciclaje endosomal de este transportador (Otegui y Spitzer, 2008), de donde se le considera como un marcador de endosoma de reciclaje en plantas. La caracterización bioquímica de *GNOM*, *GNL1* y *GNL2* incluye la sensibilidad o resistencia al inhibidor fúngico del transporte vesicular BFA. En *A. thaliana* *GNOM* y *GNL2* son sensibles a BFA, mientras que *GNL1* es resistente al efecto de este inhibidor (Geldner *et al.*, 2003).

Un análisis previo del proteoma de *P. vulgaris* llevó a identificar tres posibles ortólogos de *AtGNOM* en esta leguminosa, los cuales se denominaron *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3*, en función al porcentaje de identidad en aminoácidos respecto a la estructura primaria de *AtGNOM*, es decir, de 81.1 %, 71.7 % y 68.2 %, respectivamente (ver Anexo 2). El análisis por RT-qPCR mostró que los tres genes *PvGNOM* se expresan en la raíz de *P. vulgaris* tipo silvestre, si bien cada transcrito presenta un patrón de acumulación relativa distinto (Elizabeth Monroy Morales, resultados no publicados). Por su papel en el reciclaje endosomal y en la división de las células vegetales, este proyecto de investigación tuvo como propósito iniciar la caracterización funcional de los genes *PvGNOM* durante el proceso de nodulación en *P. vulgaris* y analizar el efecto inhibitorio de BFA en la células de las raíces transgénicas silenciadas en la expresión de estos genes.

Con el objetivo de analizar el papel de cada gen *PvGNOM* en el proceso de nodulación, se diseñó una estrategia de genética reversa basada en la expresión de moléculas RNAi gene-específicas (*PvGNOM1-i*, *PvGNOM2-i* y *PvGNOM3-i*) en

raíces transgénicas de *P. vulgaris*. No obstante, cabe mencionar que no se logró obtener la construcción para silenciar la expresión del gen *PvGNOM3* (pTdT-*PvGNOM3-i*).

El análisis de acumulación relativa de los transcritos *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3* en las raíces que expresan *PvGNOM1-i* o *PvGNOM2-i* demostró el silenciamiento específico de los genes blanco (Figura 24). Aparentemente no existe retro-regulación de los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2*; es decir, el patrón de acumulación de *PvGNOM2* no se altera al silenciar *PvGNOM1* y viceversa (Figura 25). Tampoco se observa un efecto en la acumulación relativa del transcrito *PvGNOM3*.

Al evaluar la capacidad de nodulación de las raíces transgénicas silenciadas en la expresión de *PvGNOM1* o de *PvGNOM2* e inoculadas con una cepa de *R. tropici* que expresa GUS, se observó que tienden a generar un mayor número de nódulos que en las raíces transgénicas control (pTdT-SAC). La tendencia es más notoria al cuantificar los nódulos desarrollados a los 21 dpi (Tabla 2). Si bien, a los 7 dpi no parece haber una diferencia entre el número de nódulos que se generan en las raíces transgénicas silenciadas y las control (Tabla 2), sería pertinente evaluar si el número de eventos de infección, la formación de hilos de infección y el desarrollo de primordios de nódulos se ven afectados por el silenciamiento de los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2*, lo que pudiera redundar en una mayor capacidad de nodulación, es decir, una alteración en la regulación de la nodulación. Se sabe que durante el proceso de nodulación, la leguminosa controla el número de nódulos que se forman, mediante un mecanismo que involucra un complejo de señalización a larga distancia que va desde la raíz hacia el tallo (en inglés, root-shoot). A este mecanismo se le conoce como autorregulación de la nodulación o AON (Ferguson *et al.*, 2010); mutantes con pérdida de función en genes involucrados en AON exhiben un incremento en el número de nódulos, es decir, presentan un fenotipo de hipernodulación (Schnabel *et al.*, 2011; Kassaw *et al.*, 2015). Por lo tanto, el fenotipo de incremento en el número de nódulos observado en las raíces transgénicas silenciadas permite pensar que, opuesto a lo planteado

en este proyecto, los genes *PvGNOM1* o *PvGNOM2* pudieran tener una función asociada a la AON, potencialmente como reguladores negativos. Sin embargo, antes de rechazar la hipótesis enunciada en este estudio, sería pertinente determinar el número de eventos de infección en las raíces silenciadas.

Otro aspecto fenotípico que se evaluó es el diámetro de los nódulos generados en las raíces silenciadas en los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2*. En las mutantes *gnom* de *A. thaliana* el embrión presenta alteraciones en el patrón del eje apical-basal desde la primera división celular, lo que conduce a modificaciones en la expansión de las células. En buena medida, el inicio de la nodulación y el desarrollo del nódulo están regulados por el re-inicio del ciclo celular de las células corticales adyacentes al sitio de infección y a la determinación del plano de la división celular (*p.e.* en *P. vulgaris* es anticlinal). Por lo que se decidió evaluar el diámetro de los nódulos, como un parámetro de comparación. Del análisis del diámetro de los nódulos (Figura 26) se desprende que el silenciamiento de los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2* tiene dos efectos sobre el tamaño de los nódulos respecto a lo observado en nódulos desarrollados en las raíces transgénicas control (pTdT-SAC). Por un lado, a los 7 y 14 dpi, el diámetro de los nódulos en las raíces silenciadas tiende a ser mayor que el de los nódulos en raíces transgénicas control, mientras que a los 21 dpi, el diámetro promedio es menor. En su conjunto, las características de los nódulos generados en las raíces silenciadas sugieren que los genes *PvGNOM* tienen un papel en el desarrollo del nódulo. A partir de esta observación es plausible considerar que la desregulación de *PvGNOM1* y *PvGNOM2* afecta la infección y expansión celular en esta última etapa de la organogénesis del nódulo. Los datos del diámetro de los nódulos sugieren que el desarrollo de los nódulos en las raíces transgénicas silenciadas, medido como el diámetro del nódulo, no alcanza la madurez. Es decir, alrededor de los 14 dpi, en estas raíces los nódulos no sostienen su desarrollo y tienden a permanecer en una fase tipo estacionaria, en la que el vaciado de las bacterias al interior de las células del tejido central del nódulo y su expansión pudiera estar disminuido. El análisis histológico permitiría determinar si en estos nódulos existe una correlación

entre el diámetro del nódulo, y el número y tamaño de las células infectadas. En este orden de ideas, en el nódulo tipo silvestre, las células infectadas se expanden conforme avanza la infección y las bacterias se diferencian a bacteroide. Los bacteroides, aproximadamente 2-3 veces más largos que las bacterias y rodeados por una matriz proteica, están contenidos en un simbiosoma que pueden llegar a medir 1-2 μm de diámetro y 5-7 μm de largo en los nódulos de frijol (Montiel *et al.*, 2012; Arthikala *et al.*, 2014). Por lo tanto, determinar el número de bacterias *versus* bacteroides por célula infectada aportaría elementos adicionales en el análisis de la diferencia en tamaño de los nódulos en las raíces transgénicas silenciadas.

Otro parámetro interesante a considerar al analizar el efecto fenotípico del silenciamiento de los genes *PvGNOM* es la capacidad de fijación de nitrógeno en los nódulos de las raíces transgénicas silenciadas, ya que se observó que en estas raíces algunos de los nódulos presentaban una tonalidad rosácea, típica de los nódulos fijadores de nitrógeno. Una disminución en el nivel de fijación de nitrógeno en los nódulos de las raíces transgénicas silenciadas reforzaría la hipótesis de un retraso o inhibición en el desarrollo de estos nódulos (Montiel *et al.*, 2012; Arthikala *et al.*, 2013; Arthikala *et al.*, 2014).

En otro contexto, otra posible explicación a la diferencia de diámetro en los nódulos silenciados pudiera estar relacionada a una alteración en la regulación del ciclo celular. En un estudio en células de *A. thaliana*, Dhonukshe y cols. (2007) mostraron que GNOM está presente durante la citocinesis en el sitio de formación de la placa celular (estructura membranosa que da origen a la MP y pared celular que separará a las células hijas). De donde, sería interesante determinar, mediante estudios de histología y ultraestructura, si los nódulos de las raíces transgénicas *PvGNOM1-i* y *PvGNOM2-i* presentan una alteración en la formación de la placa celular. Así mismo, sería relevante complementar este análisis con una evaluación de la expresión de genes específicos de la división celular como la ciclina CYCB, la syntaxina KNOLLE esencial para la formación de la placa celular (Tesis de licenciatura de Emmanuel Ayala Guzman, 2016), los genes KEULE tipo

Munc8/Sec1, reguladores de la función de KNOLLE (Tesis de licenciatura de Jonathan Gilberto Cuellar Vega), entre otros.

En *A. thaliana* la pérdida de función de GNOM altera el reciclaje endosomal y distribución subcelular del transportador de auxinas PIN, por lo que se afecta la división y elongación celular en raíces (Feraru *et al.*, 2011; Luschnig y Vert, 2014; Naramoto *et al.*, 2014; Takatsuka y Umeda, 2014). De donde, sería interesante explorar si el reciclaje endosomal de PIN está alterado en las raíces transgénicas y nódulos silenciados en la expresión de los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2*, lo que aportaría elementos sobre la función de estos genes. Con este propósito y como punto de partida, en este trabajo se monitoreó el marcaje y distribución subcelular del marcador fluorescente FM1-43 y el efecto del inhibidor del transporte vesicular BFA en raíces de *P. vulgaris* tipo silvestre y en las raíces transgénicas. Tanto en pelos radicales de *P. vulgaris* tipo silvestre como en las células corticales de las raíces transgénicas control, el FM1-43 se internaliza generando un patrón intracelular punteado (Figuras 27 y 29A). Cuando se agrega el inhibidor BFA, se observa una disminución en la internalización del FM1-43 y, en vez de presentar el patrón punteado, la fluorescencia de FM1-43 se acumula en estructuras subcelulares semejantes a las reportadas como compartimentos tipo BFA, un escenario similar a lo reportado por otros grupos (Ovečka *et al.*, 2005; Jelínková *et al.*, 2015).

Respecto a la visualización *in vivo* de la dinámica de marcaje e internalización de FM1-43 en células corticales de las raíces transgénicas silenciadas en los genes *PvGNOM1-i* o *PvGNOM2-i*, las imágenes capturadas mostraron que la fluorescencia de FM1-43 al interior de las células de las raíces transgénicas *PvGNOM1-i* C4 y *PvGNOM2-i* C1 presenta una distribución en cúmulos con apariencia esférica u ovalada, similar a las características que presentan los compartimentos tipo BFA (Figuras 29 y 30). En las células de las raíces *PvGNOM1-i* C2 y *PvGNOM2-i* C2 no se observa la internalización de FM1-43. A partir de estas observaciones, se deduce que, en las células corticales (y potencialmente en el resto de células de la raíz) de las raíces transgénicas

silenciadas en *PvGNOM1* o *PvGNOM2*, el transporte vesicular endocítico y de reciclaje endosomal está alterado (Figuras 29 y 30). La similitud entre el patrón de fluorescencia en las células del córtex de las raíces transgénicas *PvGNOM1-i C4* o *PvGNOM2-i C1* (Figuras 29 y 30) y el de las células pre-incubadas con BFA (Figura 31) sugiere que la desregulación en la expresión de estos genes fenocopia la formación de compartimientos BFA, es decir, que la actividad de *PvGNOM1* y *PvGNOM2* es sensible a BFA. Es importante mencionar que si bien la BFA es un reactivo ampliamente utilizado en la caracterización de transporte vesicular en células animales y vegetales ya que inhibe el tráfico de proteínas en el sistema endomembranal, la identificación del organelo o membrana blanco de BFA ha sido tema de debate, en buena medida depende del tipo de células analizadas, la concentración de BFA usada y la proteína monitoreada (Nebenführ *et al.*, 2002; D'Souza-Schorey y Chavier, 2006). De manera general, se considera que en células animales, el bloqueo inducido por BFA es acompañado por una alteración estructural del sistema secretorio, muy notablemente en el aparato de Golgi, que se hace extensamente tubular y finalmente se fusiona con el RE. En estas células los blancos de la BFA son las proteínas ARF-GEF GBF1, BIG1 y BIG2, necesarias para la formación de las vesículas tipo COPI involucradas en el transporte vesicular intra-Golgi (D'Souza-Schorey y Chavier, 2006). En cuanto al efecto de la BFA en células vegetales, se describe como una disminución de las cisternas *cis* y un aumento en el tamaño del TGN/EE por la acumulación de membranas del Golgi, resultando en la formación de los compartimientos tipo BFA, y en algunos casos causa la fusión del Golgi con el RE o híbridos RE-Golgi (Ritzenthaler *et al.*, 2002; Tse *et al.*, 2007).

Según se reporta en la literatura, la sensibilidad/resistencia a la BFA en GNOM, GNL1 y GNL2 parece estar asociada a la presencia de un residuo metionina (Met) o leucina (Leu), respectivamente. Una metionina ocupa la posición 696 del dominio Sec7 de las proteínas GNOM y GNL2 (sensibles), mientras que en GNL1 (resistente), esta posición la ocupa un residuo leucina (Leu), respectivamente. Cuando en *AtGNOM* el residuo Met es sustituido por un residuo Leu (M696L), se

genera una variante que es resistente a BFA (Geldner *et al.*, 2003; Teh y Moore, 2007; Nielsen *et al.*, 2012). En el caso de las secuencias en aminoácidos de *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3*, se encontró que en *PvGNOM1* y *PvGNOM2* la posición equivalente al residuo 696 de *AtGNOM* también está ocupada por un residuo Met, lo que parece explicar su sensibilidad a BFA; mientras que *PvGNOM3* tiene un residuo Leu en esa posición, lo que permite postular que es resistente a BFA. En el caso del dominio Sec 7 de las proteínas ARF-GEF de mamífero GBF1 (número de acceso AAI17683) y BIG2 (número de acceso Q9Y6D5), sensibles a la BFA, presentan un residuo metionina en la posición equivalente (Met731 y Met778, respectivamente). Mientras que en la proteína BRAG2 (número de acceso Q6DN90), resistente a la BFA es el residuo Leu661 (R. Sánchez López, resultados no publicados).

El presente trabajo es una estrategia que busca responder a la pregunta: ¿tienen los genes GNOM algún papel en la simbiosis leguminosa-rizobia?. Los datos obtenidos en este trabajo indican que la respuesta es afirmativa, la desregulación en la expresión de los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2* afecta el número y el diámetro de los nódulos. Resta identificar las respuestas celulares y moleculares que pudieran estar participando en este fenotipo. Algunas hipótesis sobre los posibles mecanismos celulares involucrados han sido ya planteadas. Desde el punto de vista molecular, sería interesante también explorar qué mecanismos están afectados por el silenciamiento de los genes *PvGNOM1* y *PvGNOM2*. Por ejemplo, la activación del receptor tipo cinasa SymRK, cuya función es esencial para la formación del hilo de infección, la división de las células corticales adyacentes al sitio de infección, la formación del primordio de nódulo, la liberación de rizobios al espacio intracelular y la formación del simbiosoma (Sánchez-López *et al.*, 2011; Sánchez-López *et al.*, 2012). La endocitosis y reciclaje endosomal de SymRK es una posibilidad que está siendo explorada en nuestro laboratorio (tesis de doctorado de M.C. Raúl Dávila Delgado). En este contexto, el análisis de la distribución subcelular de SymRK en las raíces transgénicas silenciadas en *PvGNOM1* y *PvGNOM2* será uno de los aspectos a caracterizar en un futuro.

8. CONCLUSIONES

La interferencia de RNA (RNAi) es un proceso post-transcripcional, altamente conservado, inducido en organismos eucariontes por RNAs de doble cadena (dsRNA), homólogos en secuencia al gene a silenciar, responsables de la degradación del RNA mensajero (mRNA), lo que resulta en la regulación de la expresión de genes. La adaptación metodológica de este proceso con el propósito de silenciar o desregular selectivamente la expresión de genes de interés ha resultado en una herramienta molecular de genética reversa muy valiosa, sobretodo en aquellos organismos en los que los métodos de genética (generación y selección de mutantes) están poco desarrollados, tal es el caso de *P. vulgaris*. Así, en este trabajo, se utilizó la estrategia de silenciamiento gene-específico mediada por RNAi para estudiar el papel de los genes *PvGNOM* durante la nodulación en raíces de *P. vulgaris*.

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- Si bien los tres genes *PvGNOM* se expresan en toda la raíz, el análisis de las raíces transgénicas *PvGNOM1-i* y *PvGNOM2-i* sugiere que no hay una retro-regulación en su expresión.
- Las raíces transgénicas *PvGNOM1* y *PvGNOM2*, tienden a generar un mayor número de nódulos (21 dpi) que las raíces transgénicas control.
- En promedio, los nódulos de 7 y 14 dpi generados en las raíces transgénicas silenciadas tienen un diámetro mayor que los nódulos de las raíces transgénicas control.
- El silenciamiento de *PvGNOM1* o *PvGNOM2* pudiera afectar la última etapa del desarrollo de los nódulos, ya que a los 21 dpi no llegan a tener el diámetro promedio esperado.
- En los pelos radicales tipo silvestre y en las células corticales de raíces transgénicas control pre-tratados con BFA, el marcador de endocitosis FM1-43 se acumula en compartimentos tipo BFA.

- Las raíces transgénicas silenciadas en *PvGNOM1-i* y *PvGNOM2-i* fenocopian la formación de compartimentos tipo BFA.

9. ANEXOS

Anexo 1. Características fenotípicas de mutantes *gnom/emb30/fwr.van7* de *A. thaliana*.

emb30 (*embryo defective 30*): las plantas *emb30* muestran una variedad de fenotipos, sin embargo, todas ellas carecen de raíz y presentan alteraciones en el eje apical-basal. Las mutantes más severas generan plántulas oblongas (más anchas que largas), o con forma de balón o de cono, sin un verdadero hipocótilo. Las mutantes menos severas desarrollan cotiledones e hipocótilo anormales (Mayer *et al.*, 1993).

emb30-1: mutación puntual en el aminoácido 658, que cambia un residuo de ácido glutámico por uno de lisina. La mutación afecta la división, elongación y adhesión celular en *A. thaliana*, observándose defectos en la forma y organización celular (Shevell *et al.*, 1994).

gnom^{B/E} (*gnom^{B4049/emb30-1}*): planta trans-heterocigota, presenta una mutación sin sentido en el dominio catalítico Sec7. El fenotipo de las plántulas muestra fusión de cotiledones así como una reducción en la longitud de la raíz principal. Las plantas *gnom^{B/E}* producen inflorescencias, sin embargo, la floración está retrasada (Geldner *et al.*, 2004).

gnom^{R5}: tiene una deleción de 1 pb que altera el marco abierto de lectura del extremo C-terminal, generando una proteína truncada. Las plántulas también muestran cotiledones fusionados así como una reducción en el largo del hipocótilo y de la raíz. Las raíces muestran un comportamiento agravitrópico y se detiene la actividad meristemática de la raíz (Geldner *et al.*, 2004).

Las mutantes *gnom^{B/E}* and *gnom^{R5}* son fuertemente afectadas en la formación de raíces laterales. Mientras que las mutantes *gnom^{B/E}* generan pocas raíces laterales, las *gnom^{R5}* no forman, debido a defectos en el transporte de auxinas (Geldner *et al.*, 2004).

gnom^{SIT4}: presenta un cambio de G por A que produce un codón de término prematuro, que trunca la proteína GNOM después del aminoácido 983. El fenotipo es similar al de *gnom^{R5}* (Geldner *et al.*, 2004).

fwr (*fewer roots*): tiene una sustitución de 1 pb en *GNOM*, que produce una mutación sin

sentido en el marco de lectura abierto (Ser a Phe), en el dominio HSD2. El fenotipo muestra una reducción en la formación de raíces laterales; la mutación afecta el patrón de respuesta a auxinas en la raíz (Okumura *et al.*, 2013).

gnom^{miz2} (*mizu-kusseï2*): mutación localizada en la región intermedia entre los dominios HDS1 y HDS2. Las mutantes *gnom^{miz2}* muestran defectos en la respuesta hidrotópica y fototópica (Moriwaki *et al.*, 2014).

van7 (*vascular network defective7*): fue re-nombrada *emb30-7* como un nuevo alelo mutante de *EMB30/GNOM* (Koizumi *et al.*, 2000); muestra un fenotipo de cotiledones fusionados, con patrones aberrantes en la vasculatura de la hoja (alteraciones morfológicas en las hojas de roseta), no presentan formación de raíces laterales y muestra defectos en el gravitropismo de la raíz (Naramoto *et al.*, 2014).

Anexo 2. A, Porcentaje de identidad de las proteínas tipo GNOM en *P. vulgaris* respecto a la secuencia peptídica de *AtGNOM*, *AtGNL1* y *AtGNL2*. **B**, Porcentaje de identidad y similitud de cada uno de los dominios (DCB, HUS, SEC7, HDS1, HDS2 y HDS3) de las proteínas *PvGNOM* con respecto a los dominios de la proteína *AtGNOM*.

A

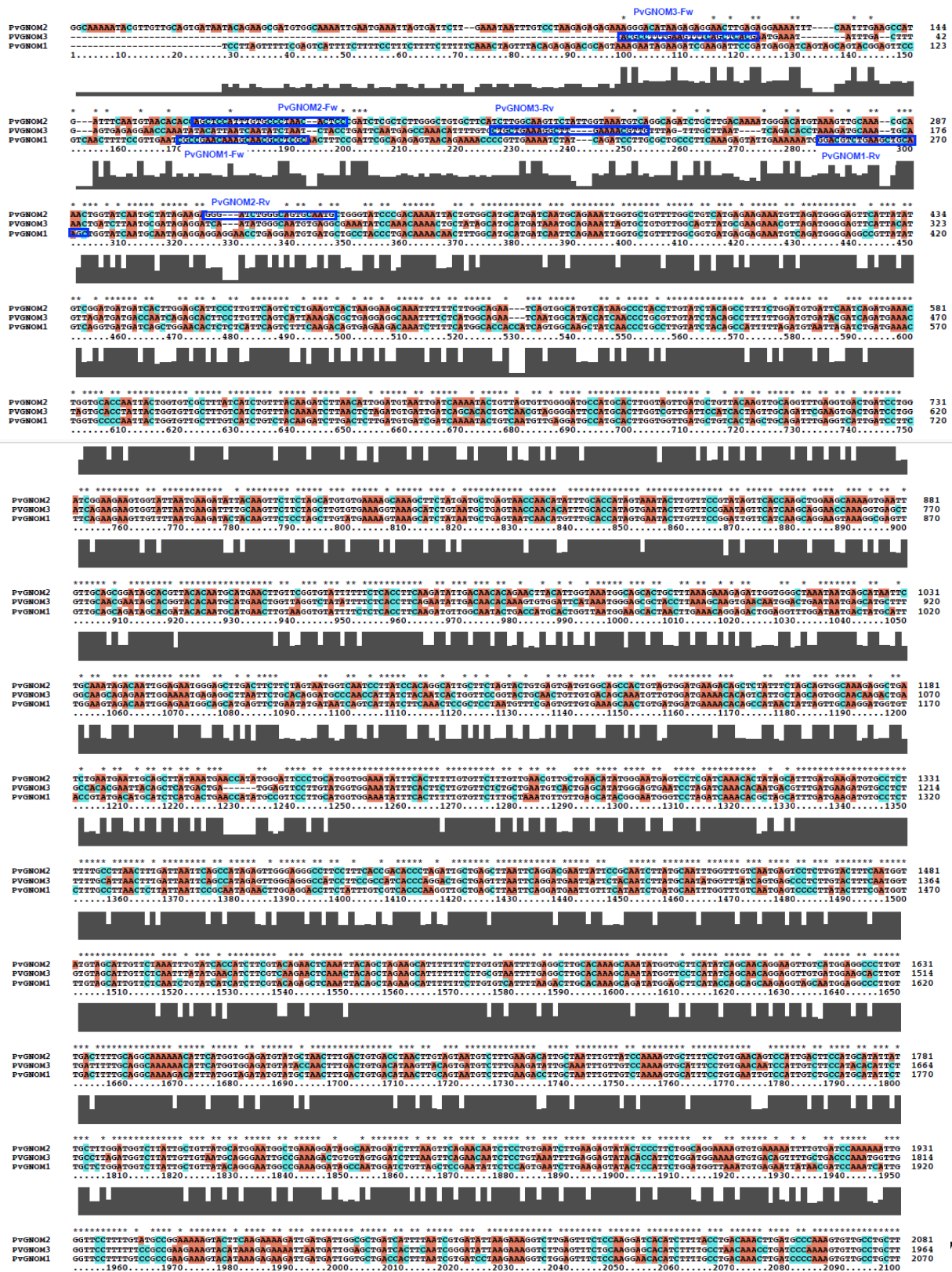
	PvGNOM1 Phvul.001G235300	PvGNOM2 Phvul.008G231400	PvGNOM3 Phvul.001G235400	GNL1 AT5G39500	GNL2 AT5G19610
GNOM AT1G13980	81.10%	71.70%	68.20%	61%	41%
GNL1 AT5G39500	62%	59%	58%		36%
GNL2 AT5G19610	40%	38%	37%		

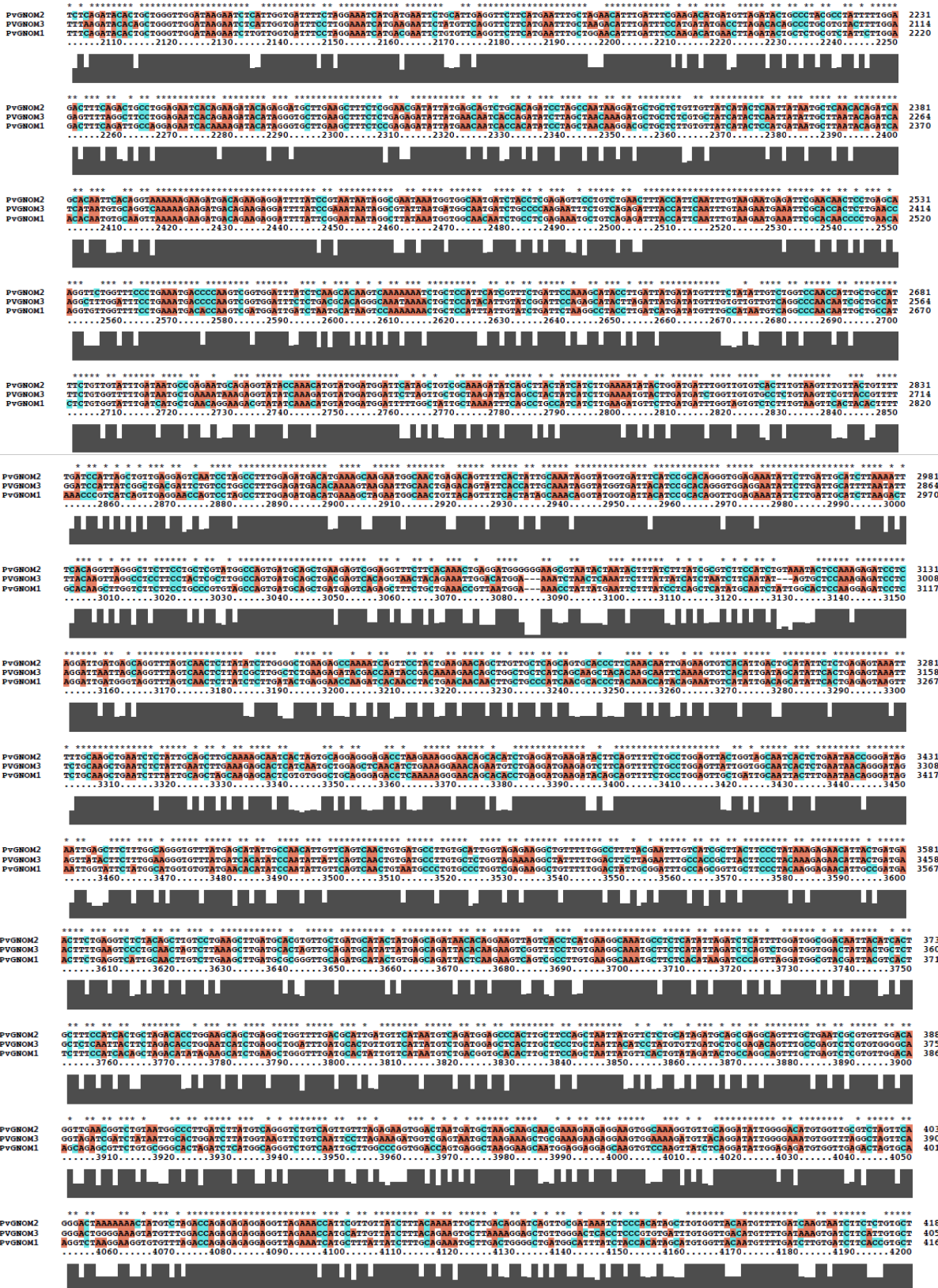
B

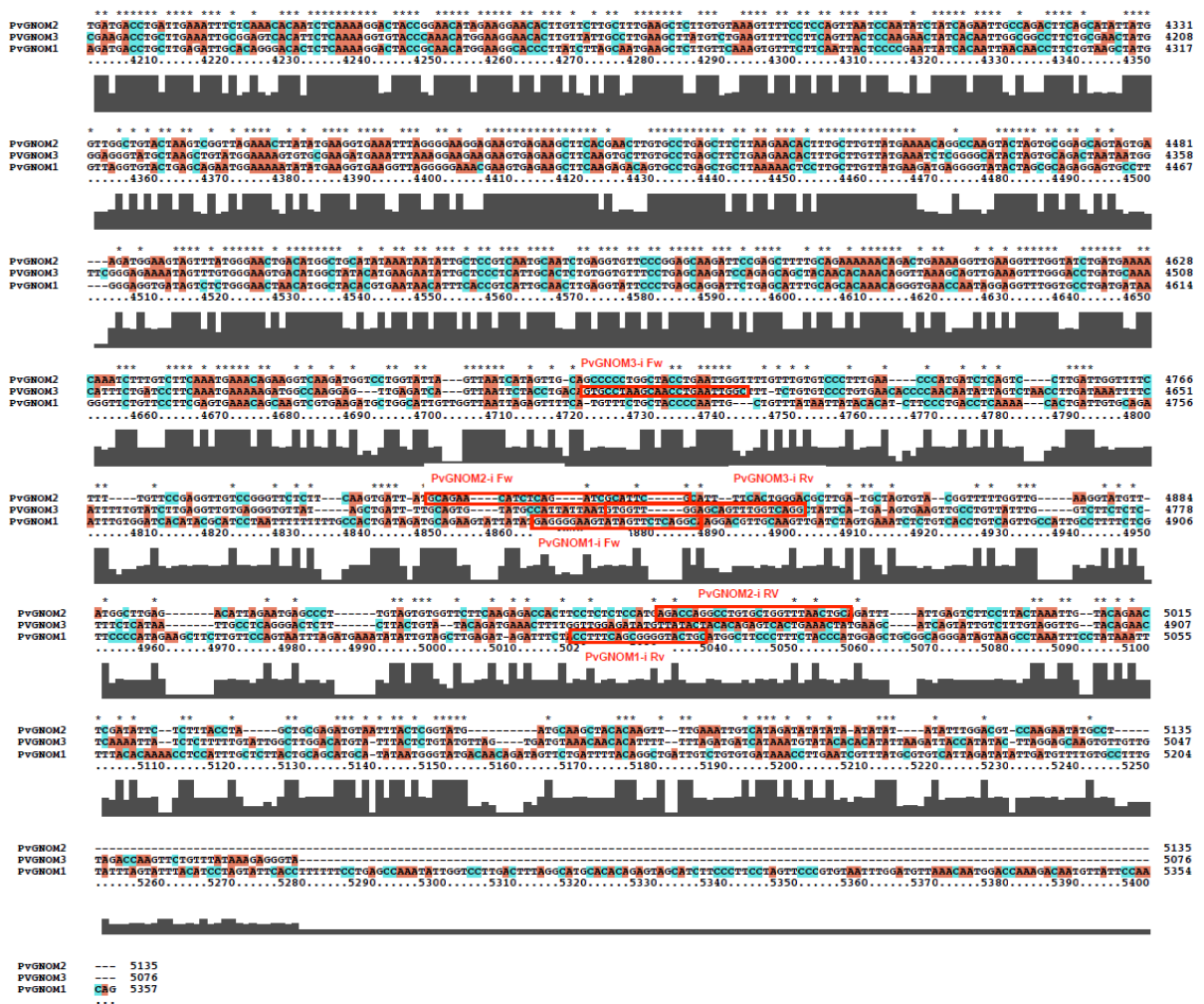
Dominios

Gene	Número de acceso		DCB	HUS	SEC7	HDS1	HDS2	HDS3
<i>PvGNOM1</i>	>Phvul.001G235300	Identidad	79.5	87.7	93.5	90.8	90.3	84.3
		Similitud	90.1	92.5	96.2	96.6	95.1	88.7
<i>PvGNOM2</i>	>Phvul.008G231400	Identidad	78.4	85	87.6	73.7	80.5	68.7
		Similitud	90.1	90.9	93.5	91.4	88.6	82.6
<i>PvGNOM3</i>	>Phvul.001G235400	Identidad	75.8	80.2	84.3	72.6	74.6	71.3
		Similitud	88.8	88.8	91.4	86.9	85.9	80.9

Anexo 3. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes *PvGNOM1*, *PvGNOM2* y *PvGNOM3*, y la ubicación de los pares de oligonucleótidos gene-específicos, utilizados para los ensayos de RT-qPCR (color azul), y para el silenciamiento (color rojo).







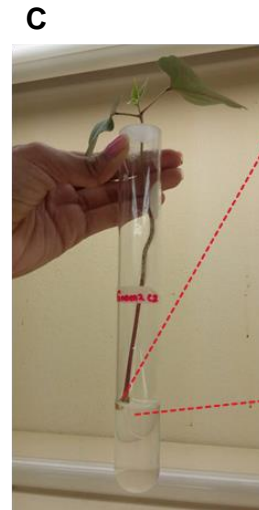
Anexo 4. Ilustración de algunas etapas en la generación de raíces transgénicas.

A, Plántula de *P. vulgaris* de 2 dpg, sostenida con unas pinzas estériles, inoculada con *A. rhizogenes* K599 (flecha roja).

B, Se coloca la plántula en el orificio del papel aluminio que cubre un tubo Falcon de 15 ml que contiene medio Fährhaus estéril, que a su vez está en un tubo de vidrio de 20 cm estéril.

C, Planta a la que se le eliminó la raíz principal y las raíces pilosas no fluorescentes (no raíces transgénicas), colocada en tubo de vidrio con medio Fährhaus sellado con Parafilm para evitar la evaporación del medio.

D, Imagen representativa de una planta con raíces transgénicas.

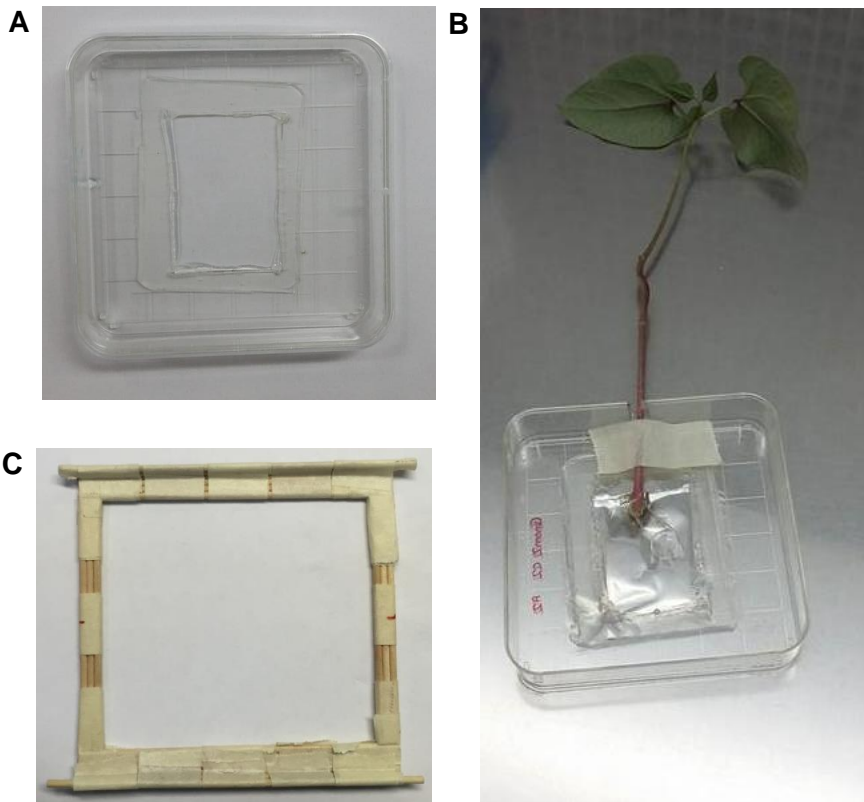


Anexo 5. Montaje de planta de *P. vulgaris* con raíces transgénicas para ser observadas al microscopio confocal invertido de disco giratorio (Zeiss Observer Z.1) del LNMA del Instituto de Biotecnología-UNAM.

A, Caja Petri modificada siguiendo las instrucciones del Dr. Luis Cárdenas: a una caja Petri cuadrada (90 X 90 X 15 mm) se le hace un orificio rectangular, de aproximadamente 45 x 60 mm en el centro, que se cubre por la parte exterior de la caja Petri con un cubreobjetos (48 x 65 mm), pegado con silicón. Para evitar el maltrato de la planta, se hace una ranura en el borde de la caja de Petri en donde se colocará el tallo de la planta.

B, Montaje de la planta con raíces transgénicas. Se coloca la planta de manera que las raíces queden extendidas sobre el cubreobjetos y el tallo en la ranura de la caja Petri. Se adicionan 2 ml de medio Fåhraeus líquido a las raíces y se cubren con una película de papel de celulosa (celofán dulce) que tiene oradaciones para la adición de reactivos durante la observación de las raíces transgénicas al microscopio.

C, Accesorio hecho con palillos de madera que permite el soporte de la caja Petri cuadrada en la platina del microscopio Zeiss Observer Z.1



10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, pp.1256.
- Anders, N. y Jürgens, G. 2008. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65:3433-3445.
- Angers, C. G. y Merz, A. J. 2010. New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22:18-26.
- Arthikala, M., Montiel, J., Nava, N., Santana O., Sánchez-López R., Cárdenas L. y Quinto C. 2013. PvRbohB negatively regulates Rhizobium irregularis colonization in Phaseolus vulgaris. *Plant and Cell Physiology*, 54:1391-1402.
- Arthikala, M. K., Sánchez-Lopez, R., Nava, N., Santana, O., Cárdenas, L. y Quinto, C. 2014. RbohB, a Phaseolus vulgaris NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytologist*, 202:886-900.
- Ayala, G. E. 2016. Análisis espacio-temporal de la actividad del promotor del gen *PvKNOLLE* en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* durante la nodulación. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Baluška, F. y Wan, Y. L. 2012. *Endocytosis in Plants*. Berlin: Springer, pp.123-149.
- Bassham, D. C., Brandizzi, F., Otegui, M. S. y Sanderfoot, A. 2008. The Secretory System of Arabidopsis. *Arabidopsis Book/ American Society of Plant Biologists*, 6:1-5.
- Bitocchi, E., Nannia, L., Belluccia, E., Rossia, M., Giardinia, A., Spagnoletti, P., Logozzob, G., Stougaard, J., McCleand, P. y Attene, G. 2012. Mesoamerican origin of the common bean (*P. vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:E788-E796.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N. y Satiat-Eunemaitre, B. 2004. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells, *Journal of Microscopy*, 214:159-173.
- Bonifacino, J. y Glick, B. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116:153-166.
- Brewin, N. 2010. Root Nodules (Legume–Rhizobium Symbiosis). *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-5.
- Broughton, W., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. y Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252: 55-128.

- Cai, H., Reinisch, K. y Ferro-Novick, S. 2007. Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Developmental Cell*, 12:671-682.
- Campanoni, P. y Blatt, M. R. 2007. Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *Journal of Experimental Botany*, 58:65-74.
- Casanova, J. E. 2007. Regulation of Arf Activation: the Sec7 Family of Guanine Nucleotide Exchange Factors. *Traffic*, 8:1476-1485.
- Cevher-Keskin, B. 2013. ARF1 and SAR1 GTPases in Endomembrane Trafficking in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:18181-18199.
- Chen, X., Irani, N. y Friml, J. 2011. Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:674-82.
- Contento, L. y Bassham, D. 2012. Structure and function of endosomes in plant cells. *Journal of Cell Science*, 125:3511-3518.
- Cuellar, V. G. 2016. Efecto del silenciamiento de genes PvKEULE en la nodulación de *Phaseolus vulgaris*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- D'Souza-Schorey, C. y Chavrier, P. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:347-58.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D., Mravec, J., Stierhof, Y. y Friml, J. 2007. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 17:520-7.
- Dong-Jie, J., Xi, C., Wei, W., Xiao-Yun, T., Xue-Qin, Z., Li-Qun, C. y De, Y. 2009. GNOM-LIKE 2, Encoding an Adenosine Diphosphate-Ribosylation Factor-Guanine Nucleotide Exchange Factor Protein Homologous to GNOM and GNL1, is Essential for Pollen Germination in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51:762-773.
- Downie, J. 2007. Rhizobia. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-8.
- Doyle, S., Ash, H., Thomas, V., Adeline, A., Corrado, V. y cols. 2015. An early secretory pathway mediated by GNOM-LIKE 1 and GNOM is essential for basal polarity establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2:E806-E815.
- Du Toit, A. 2014. Activating root nodule organogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 12:235.
- Du, W., Tamura, K., Stefano, G. y Brandizzi, F. 2013. The integrity of the plant Golgi apparatus depends on cell growth-controlled activity of GNL1. *Molecular Plant*, 6:905-15.
- Dubrovsky, J. G. y Shishkova, S. 2007. Enigmas de la raíz: la parte oculta de la planta. *Biotecnología*, 14:204-212.

- Ebine, K. y Ueda, T. 2008. Unique mechanism of plant endocytic/vacuolar transport pathways. *Journal of Plant Research*, 122:21-30.
- Emons, A. M. C. y Ketelaar, T. 2009. *Root Hairs Plant Cell Monographs*. Germany: Springer, pp.300.
- Fan, L., Li, R., Pan, J., Ding, Z. y Lin, J. 2015. Endocytosis and its regulation in plants. *Trends in Plant Science*, 20:388-97.
- Fanglei, L., Lu, W., Li-Bo, Y., Xiongbo, P. y Mengxiang, Sun. 2010. NtGNL1 Plays an Essential Role in Pollen Tube Tip Growth and Orientation Likely via Regulation of PostGolgi Trafficking. *Public Library of Science*, 5:1-9.
- Feraru, E., Feraru, M. I., Kleine-Vehn, J., Martinière, A., Mouille, G., Vanneste, S., Vernhettes, S., Runions, J. y Friml, J. 2011. PIN polarity maintenance by the cell wall in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 21:338-343.
- Ferguson, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, D. y Gresshoff, P. 2010. "Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation". *Journal of Integrative Plant Biology*, 52:61-76.
- Folch-Mallol, J., Marroquí, S., Sousa, C., Manyani, H., López-Lara, I., van der Drift, K., Haverkamp, J., Quinto, C., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Spaik, H. y Megías M. 1996. "Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 Nodulation factors: the role of nodH and nodPQ genes in their sulphation". *Molecular Plant-microbe Interactions*, 9:151-63.
- Foreman, J. y Dolan L. 2001. Root Hairs as a Model System for Studying Plant Cell Growth. *Annals of Botany Company*, 88:1-7.
- Franzmann, L. H., Yoon, E. S., y Meinke, D. W. 1995. Saturating the genetic map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *The Plant Journal*, 7:341-350.
- Frigerio, L. 2012. Plant Exocytosis, Endocytosis and Membrane Recycling in Turgid Cells. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-6.
- Gage, J. 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:280-300.
- Gary, K. y Carolyn, F. 2007. Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 5:107-118.
- Geldner, N., Anders, A., Wolters, H., Keicher, H., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. y Jürgens, G. 2003. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF Mediates Endosomal Recycling, Auxin Transport, and Auxin-Dependent Plant Growth. *Cell*, 112:219-230.

- Geldner, N., Richter, S., Vieten, A., Marquardt, S., Torres-Ruiz, R., Mayer, U. y Jürgens, G. 2004. Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development*, 131:389-400.
- Gepts, P. 2001. *P. vulgaris* (Beans). *Plant Science*, 1-2.
- Grierson, C., Nielsenb, E., Ketelaar, T. y Schiefelbeind, J. 2014. Root Hairs. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 12:1-25.
- Guo, J., Wei, J., Xu, J. y Sun, M. 2014. Inducible knock-down of GNOM during root formation reveals tissue-specific response to auxin transport and its modulation of local auxin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 64:1165-1179.
- Haag, A., Markus, F., Kamila A., Kerscher, B., Sergio, A., Zanda, M., Mergaert, P. y Ferguson, G. 2013. Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium-legume symbiosis. *Federation of European Microbiological Societies*, 37:364-383.
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A. y Bashir, S. 2014. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54:580-592.
- Holstein, S. E. 2002. Clathrin and plant endocytosis. *Traffic*, 3:614-620.
- Hong-Yan, Y. y Hong-Wei, X. 2011. Signals and mechanisms affecting vesicular trafficking during root growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:571-579.
- Hossain, S., Joshi, T. y Gary, S. 2015. System approaches to study root hairs as a single cell plant model: current status and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 6:1-7.
- Jaillais, Y., Santambrogio, M., Rozier, F., Fobis-Loisy, I., Miege, C. y Gaude, T. 2007. The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell*, 130:1057-1070.
- Jelínková, A., Malínská, K., Simon, S., Kleine-Vehn, J., Fílová-Pařezová, M., Pejchar, P., Kubes, M., Martinec, J., Friml, J., Zazimalová, E. y Petrásek, J. 2010. Probing plant membranes with FM dyes: tracking, dragging or blocking. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 61:883-892.
- Jelínková, A., Müller, K., Fílová-Pařezová, M. y Petrásek, J. 2015. NtGNL1a ARF-GEF acts in endocytosis in tobacco cells. *Plant Biology*, 15:1-14.
- Jia, D., Cao, X., Wang, W., Tan, X., Zhang, X., Chen, L. y Ye, D. 2009. GNOM-LIKE 2, encoding an adenosine diphosphate-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor protein homologous to GNOM and GNL1, is essential for pollen germination in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51:762-73.

- Jones, K., Kobayashi, H., Davies, B., Taga M. y Walker, G. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*–*Medicago* model. *Microbiology*, 5:619-633.
- Jürgens, G. 2004. Membrane trafficking in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20:481-504.
- Kassaw, T., Bridges, W. y Frugoli, J. 2015. Multiple Autoregulation of Nodulation (AON) Signals Identified through Split Root Analysis of *Medicago truncatula* sunn and *rdn1* Mutant. *Plants*, 4:209-224.
- Ke, D., Fang, Q., Chen, C., Zhu, H., Chen, T., Chang, X., Yuan, S., Kang, H., Ma, L., Hong, Z. y Zhang, Z. 2012. The small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 159:131-143.
- Kereszt, A., Mergaert, P. y Kondorosi, E. 2011. Bacteroid Development in Legume Nodules: Evolution of Mutual Benefit or of Sacrificial Victims?. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 24:1300-1309.
- Kim, S. y Brandizzi, F. 2014. The plant secretory pathway: an essential factory for building the plant cell wall. *Plant Cell Physiology*, 55:687-93.
- King, G. y Weber, F. 2007. Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Microbiology*, 5:107-117.
- Koizumi, K., Naramoto, S., Sawa, S., Yahara, N., Ueda, T., Nakano, A., Sugiyama, M. y Fukuda, H. 2005. VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. *Development*, 132:1699-1711.
- Koizumi, K., Sugiyama, M. y Fukuda H. 2000. A series of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular network: calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question. *Development*, 127:3197-3204.
- Lam, S., Cai, Y., Chung, Y., Wang, J., Law, A., Pimpl, P., Chan, E., Xia, J. y Jiang, L. 2009. BFA-induced compartments from the Golgi apparatus and trans-Golgi network/early endosome are distinct in plant cells. *The Plant Journal*, 60:865-888.
- Lewis, G. P., Schrire, B., Mackinder, B. y Lock, M. 2005. *Legumes of the World*. - Royal Botanic Gardens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54:580-592.
- Libault, M., Brechenmacher, L., Cheng, J., Xu, D. y Stacey, G. 2010. Root hair systems biology, *Trends in Plant Science*, 15:1-10.
- Lindström, K. y Mousav, S. 2010. *Rhizobium and Other N-fixing Symbioses*. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-14.
- Long, S. 1996. *Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective*. *The Plant Cell*, 8:1885-1898.

- Luschnig, C. y Vert, G. 2014. The dynamics of plant plasma membrane proteins: PINs and beyond. *Development*, 141:2924-38.
- Malínská, K., Jelínková, A. y Petrášek, J. 2014. The use of FM dyes to analyze plant endocytosis. *Methods in Molecular Biology*, 1209:1-11.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. y Batut, J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes. *Trends in Microbiology*, 17:458-466.
- Mayer, U., Büttner, G. y Jürgens, G. 1993. Apical-basal pattern formation in the Arabidopsis embryo: studies on the role of the gnom gene. *Development*, 117:149-162.
- Mayer, U., Ruir, R., Berleth, T., Misera, S., y Jurgens, G. 1991. Mutations affecting body organisation in the Arabidopsis embryo. *Nature*, 532:402-407.
- McFarlane, H., Watanabe, Y., Yang, W., Huang, Y., Ohlrogge, J. y Samuels, A. 2014. Golgi- and trans-Golgi network-mediated vesicle trafficking is required for wax secretion from epidermal cells. *Plant Physiology*, 164:1250-1260.
- Meinke, D. W. 1991. Perspectives on genetic analysis of plant embryogenesis. *The Plant Cell*, 3:857-866.
- Mendrinna, A. y Persson, S. 2015. Root hair growth: it's a one way Street. *F1000 Prime Reports*, 23:1-6.
- Miranda, C., Maier, C. y Stevens, J. 2012. Flavonoids. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-13.
- Mocatelli, A. 2008. Endocytic pathways in pollen tube. *Plant Signaling and Behavior*, 3:325-327.
- Möller, B. y Weijers, D. 2009. Auxin Control of Embryo Patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1:1-13.
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Sánchez-López, R., Arthikala, M., Santana, O., Sánchez, F. y Quinto, C. 2012. Phaseolus vulgaris NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by Rhizobia. *Plant and Cell Physiology*, 53:1751-1767.
- Monroy-Morales, E. 2013. Análisis de la expresión de endocitosis en pelos radicales de *Phaseolus vulgaris*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Moriwaki, T., Miyazawa, Y., Fujii, N. y Takahashi, H. 2014. GNOM regulates root hydrotropism and phototropism independently of PIN-mediated auxin transport. *Plant Science*, 215:141-149.
- Morón, B., Soria-Díaz, M., Ault, J., Verroios, G., Noreen, S., Rodríguez-Navarro, D., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megías, M. y Sousa, C. 2005. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by Rhizobium tropici CIAT899. *Chemistry and Biology*, 12:1029-1040.

- Mossessova, E., Corpina, R. A. y Goldberg, J. 2003. Crystal Structure of ARF1•Sec7 Complexed with Brefeldin A and Its Implications for the Guanine Nucleotide Exchange Mechanism. *Molecular Cell*, 12:1403-1411.
- Nakano, R., Matsushima, R., Ueda, H., Tamura, K., Shimada, T., Li, L., Hayashi, Y., Kondo, M., Nishimura, M. y Hara-Nishimura. 2009. GNOM-LIKE1/ERMO1 and SEC24a/ERMO2 are required for maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21:3672-3685.
- Naramoto, S., Otegui, M., Kutsuna, N., Rycke, R., Dainobu, T., Karampelias, M., Fujimoto, M., Feraru, E., Miki, D., Fukuda, H., Nakano, A. y Friml, J. 2014. Insights into the Localization and Function of the Membrane Trafficking Regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26:3062-3076.
- Nebenführ, A., Ritzenthaler, C. y Robinson, D. G. 2002. Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion. *Plant Physiology*, 130:1102-1108.
- Nelson, M. y Sadowsky, M. 2015. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6:491:1-11.
- Nielsen, M., Feechan, A., Böhlenius, H., Ueda, T. y Thordal-Christensen, H. 2012. *Arabidopsis* ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:11443-11448.
- Oda, Y. y Fukuda, H. 2014. Emerging roles of small GTPases in secondary cell wall Development. *Frontiers in Plant Science*, 5:1-6.
- Okumura, K., Goh, T., Toyokura, K., Kasahara, H., Takebayashi, Y., Mimura, T., Kamiya, Y. y Fukaki H. 2013. GNOM/FEWER ROOTS is Required for the Establishment of an Auxin Response Maximum for *Arabidopsis* Lateral Root Initiation. *Plant and Cell Physiology*, 54:406-417.
- Oldroyd, G. E. 2007. Root-Nodules symbiosis: Molecular Basis of Nodule Formation. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7.
- Oldroyd, G. E. y Downie, J. A. 2008. Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59:519-46.
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S. y Downie, J. A. 2011. The rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis, *Annual Review of Genetics*, 45:119-144.
- Olivares, J., Bedmar, E. y Sanjuán, J. 2013. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 26:486-494.
- Otegui, M. S. y Spitzer, C. 2008. Endosomal Functions in Plants. *Traffic*, 9:1589-1598.

- Ovečka, M., Lang, I., Baluška, F., Ismail, A., Illeš, P. y Lichtscheidl, K. 2005. Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma*, 226:39-54.
- Paez-Valencia J, J., Goodman, K. y Otegui, M. S. 2016. Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. *The Annual Review of Plant Biology*, 67:309-35.
- Popp, C. y Ott, T. 2011. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:458-467.
- Poupot, R., Martinez-Romero, E., Gautier, N. y Promé, J. 1995. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *The Journal of Biological chemistry*, 270:6050-6055.
- Pucadyil, T. J. y Schmid, S. L. 2009. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science*, 325:1217-1220.
- Reyes, E., Padilla, L., Pérez, O. y López, P. 2008. Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Revista Investigación Científica*, 4:1-20.
- Richter, S., Geldner, N., Schrader, J., Wolters, H., Stierhof, Y. D., Rios, G., Koncz, C., Robinson, D. G., y Jürgens, G. 2007. Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature*, 448:488-492.
- Richter, S., Anders, N., Wolters, H., Beckmann, H., Thomann, A., Heinrich, R., Schrader, J., Singh, MK., Geldner, N., Mayerm U. y Jürgens, G. 2010. Role of the GNOM gene in Arabidopsis apical-basal patterning-From mutant phenotype to cellular mechanism of protein action. *European Journal Cell Biology*, 89:138-44.
- Richter, S., Müller, L., Stierhof, Y. D., Mayer, U., Takada, N., Kost, B., Vieten, A., Geldner, N., Koncz, C. y Jürgens, G. 2012. Polarized cell growth in Arabidopsis requires endosomal recycling mediated by GBF1-related ARF exchange factors. *Nature Cell Biology*, 14:80-86.
- Rigal, A., Doyle, S. M. y Robert, S. 2015. Live cell imaging of FM4-64, a tool for tracing the endocytic pathways in Arabidopsis root cells. *Methods in Molecular Biology*, 1242:93-103.
- Ritzenthaler, C., Nebenführ, A., Movafeghi, A., Stussi-Garaud, C., Behnia, L., Pimpl, P., Staehelin, A. y Robinson, D. 2002. Reevaluation of the Effects of Brefeldin A on Plant Cells Using Tobacco Bright Yellow 2 Cells Expressing Golgi-Targeted Green Fluorescent Protein and COPI Antisera. *The Plant Cell*, 14:237-261.
- Saad, S. y Lam-Son, P. 2014. Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Nodules: Metabolism and Regulatory Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 15:19389-19393.
- Šamaj, J., Müller, J., Beck, M., Böhm, N. y Menzel, D. 2006. Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science*, 12:594-599.

- Sánchez-López, R., Jáuregui, D., Nava, N., Alvarado-Affantranger, X., Montiel, J., Santana, O., Sanchez, F. y 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.
- Sánchez-López, R., Jáuregui, D. y Quinto, C. 2012. SymRK and the nodule vascular system: an underground connection. *Plant Signaling and Behavior*, 7:691-3.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R. 2005. GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62:3014-3038.
- Schnabel, E. L., Kassaw, T.K., Smith, L.S., Marsh, J, F., Oldroyd, G. E., Long, S. R. y Frugoli, J.A. 2011. The ROOT DETERMINED NODULATION1 Gene Regulates Nodule Number in Roots of *Medicago truncatula* and Defines a Highly Conserved, Uncharacterized Plant Gene Family. *Plant Physiology*, 157:328-340.
- Serrato, R. 2014. Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4:119.
- Shevell, D. E., Kunkel, T. y Chua, N. H. 2000. Cell Wall Alterations in the *Arabidopsis emb30* Mutant. *The Plant Cell*, 12:2047-2059.
- Shevell, D. E., Leu, W. M., Gillmor, C. S., Xia, G., Feldmann, K. A., y Chua, N. H. 1994. EM630 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell*, 77:1051-1062.
- Sieberer, B. J., Ketelaar, T., Esseling, J. J. y Emons, A. M. C. 2005. Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytologist*, 167:711-719.
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M. y Parniske, M. 2014. CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host and Microbe*, 15:139-152.
- Soyano, T. y Hayashi, M. 2014. Transcriptional networks leading to symbiotic nodule organogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 20:146-54.
- Sprent, J. 2001. Nodulation in legumes. *Annals of Botany*, 89:797-798.
- Sprent, J. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist*, 174:11-25.
- Sprent, J. 2008. 60Ma of Legume nodulation. What's new? What's changing?. *Journal of Experimental Botany*, 5:1081-1084.
- Sulieman, S. y Tran, L. 2014. Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Nodules: Metabolism and Regulatory Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 15:19389-19393.

- Takatsuka, H. y Umeda, M. 2014. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of Experimental Botany*, 65:2633-2643.
- Teh, O. K. y Moore, I. 2007. An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature*, 448:493-496.
- Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z. y Luo, Y. 2015. Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Frontiers in Plant Science*, 36:1-11.
- Tse, Y. C., Lam, S. K. y Jiang, L. 2007. Enigmatic Brefeldin A. *Plant Signaling y Behavior*, 2:199-202.
- Uemura, T. 2016. Physiological Roles of Plant Post-Golgi Transport Pathways in Membrane Trafficking. *Plant Cell and Physiology*, 57:2013-2019.
- Velasquez, S. M., Dinneny, J. R. y Estevez, J. M. 2015. *Plant Cell Expansion Methods and Protocols*, Argentina: Humana Press, pp.232.
- Wang, D., Yang, S., Tang, F. y Zhu, H. 2012. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14:334-342.
- Wang, L., Liao, F., Zhu, L., Peng, X. y Sun, M. 2008. NtGNL1 is involved in embryonic cell division patterning, root elongation, and pollen tube growth in tobacco. *New Phytologist*, 179:81-93.
- Wright, J., Kahn, R. y Sztul, E. 2014. Regulating the large Sec7 ARF guanine nucleotide exchange factors: the when, where and how of activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71:3419-3438.
- Yorimitsu, T., Sato, K. y Takeuchi, M. 2014. Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Frontiers in Plant Science*, 411:1-12.
- Zhu, H., Choi, H., Cook, D., y Shoemaker, R. 2005. Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiology*, 137:1189-1196.