



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN

TÍTULO:

Análisis funcional del gen *PvFLD α 2* durante la simbiosis de
Phaseolus vulgaris con la bacteria *Rhizobium*
tropici.

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

Tesis y Examen Profesional

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Ciencias Agrogenómicas

P R E S E N T A:

Miren Yosune Miranda Puy

Tutor Interno:

Dr. Manojkumar Arthikala

Tutora Externa:

MIBB Ma. Del Carmen Monserrat Quinto Hernández





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN

TÍTULO:

Análisis funcional del gen *PvFLD α 2* durante la simbiosis de
Phaseolus vulgaris con la bacteria *Rhizobium*
tropici.

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

Tesis y Examen Profesional

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Ciencias Agrogenómicas

P R E S E N T A:

Miren Yosune Miranda Puy

Tutor Interno:

Dr. Manojkumar Arthikala

Tutora Externa:

MIBB Ma. Del Carmen Monserrat Quinto Hernández



Agradecimientos

En primera instancia agradezco a mis formadores, personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro.

Gracias a mi universidad por haberme permitido formarme en ella, gracias a todas las personas que fueron participes en el proceso, ya sea de manera directa o indirecta, fueron ustedes quienes realizaron su aporte que el día de hoy se ve reflejado en la culminación de mi paso por la universidad.

Mi especial agradecimiento a mi directora de tesis, MIBB Ma. Del Carmen Monserrat Quinto Hernández, por darme la oportunidad y creer en mí para el desarrollo de este proyecto de investigación, por su paciencia, tiempo y dedicación. De igual forma agradezco a Ronal Pacheco por su tutoría durante el año de estancia en el iBT y a mi compañera de laboratorio Mariel Escobar por compartir el tiempo y actividades.

Expreso mi agradecimiento al doctor Manojkumar Arthikala por sus conocimientos brindados a lo largo de la carrera, su confianza y capacidad de guiar. A la beca otorgada por DGAPA-PAPIIT, UNAM No. IN213221.

Gracias a mis padres y hermano que fueron mis mayores inspiradores durante este proceso. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, principios, mi perseverancia. Gracias por todo su amor.

Mi cariño a mi mascota Cerina que siempre fue un pilar emocional.

Me agradezco a mí misma por mi perseverancia y tenacidad. Sencillo no ha sido el proceso, pero gracias a la motivación y al amor por la ciencia he logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo de mi tesis con éxito.

”Todos los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar”

Eugene Fitch Ware

Resumen

Las plantas como cualquier otro ser vivo necesitan nutrientes para crecer y desarrollarse; entre estos elementos esenciales se encuentra el nitrógeno. La mayor parte del nitrógeno se encuentra en la atmósfera, sin embargo no puede ser utilizado directamente por los seres vivos, sino a través del proceso de fijación biológica del nitrógeno. Este proceso ocurre como resultado de la interacción simbiótica entre las raíces de plantas leguminosas y rizobacterias del suelo (*rhizobia*), dando lugar a la formación de un nuevo órgano, el nódulo. La planta recibe amonio de la bacteria y la bacteria recibe a su vez, esqueletos de carbono. Esta asociación requiere de una regulación muy fina entre ambos simbioses, en donde participan un gran número de genes y proteínas tanto de la planta como de la bacteria. Entre estos se encuentran las fosfolipasas D (FLDs), que se ha sugerido que están involucradas en la regulación de dicha simbiosis. En este trabajo, se analizó mediante genética reversa, la función del gen *PvFLD α 2* en la simbiosis de frijol, *Phaseolus vulgaris* L. con *Rhizobium tropici* a los 14 y 21 días post-inoculación, con la finalidad de estudiar a nivel celular y molecular la participación de las FLDs en la regulación de la simbiosis *rhizobia*-leguminosas. Los resultados obtenidos indicaron que el silenciamiento del gen *PvFLD α 2* indujo un aumento en el número de nódulos en raíces transformadas de *P. vulgaris*, así como un cambio en la morfología de los nódulos y un ligero aumento de la fijación de nitrógeno. El gen *FLD α 2* parece estar involucrado en la regulación inicial del proceso de nodulación en la simbiosis *rhizobia*-leguminosa, probablemente a través de la vía de señalización por ácido abscísico (ABA), pudiendo haber un recambio de los fosfolípidos membranales.

Índice

1. Introducción	7
2. Planteamiento del problema	9
3. Justificación	10
4. Marco teórico	10
4.1. Simbiosis <i>PvFLDα2</i> -leguminosas	10
4.2. Mecanismos moleculares que regulan la simbiosis <i>rhizobia</i> -leguminosas	11
1.1.1. Especies reactivas de oxígeno (EROs) en la simbiosis <i>rhizobia</i> -leguminosas ...	12
1.1.2. Hormonas en la interacción simbiótica <i>rhizobia</i> -leguminosas	13
1.1.3. Reorganización del citoesqueleto en la interacción <i>rhizobia</i> -leguminosas	14
1.1.4. Regulación de los lípidos durante la simbiosis	15
4.3. Fosfolipasas D	16
5. Objetivos	19
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos específicos	19
1.1.1. Analizar la morfología y el número de los nódulos formados en raíces <i>P. vulgaris</i> con silenciamiento de <i>PvFLDα2</i> : RNAi a los 14 dpi con <i>R. tropici</i>	19
1.1.2. Cuantificar los nódulos formados en las raíces de <i>P. vulgaris</i> con silenciamiento de <i>PvFLDα2</i> a los 21 dpi.	19
1.1.3. Medir la actividad de la nitrogenasa en los nódulos de las raíces con silenciamiento de <i>PvFLDα2</i> e inoculadas con <i>R. tropici</i> (21 dpi).....	19
6. Hipótesis	19

7. Materiales y métodos.....	20
7.1. Generación de raíces transgénicas.....	20
7.2. Análisis del fenotipo de nódulos en raíces transgénicas	23
7.3. Análisis de actividad de la nitrogenasa	25
7.4. Análisis estadístico	25
8. Resultados.....	26
8.1. Número de nódulos en raíces transgénicas.....	26
8.2. Análisis de la actividad de la nitrogenasa.....	31
9. Discusión	33
10. Conclusiones	36
11. Bibliografía.....	37
12. Anexos.....	49

1. Introducción

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo de las plantas, siendo el componente principal de los aminoácidos y ácidos nucleicos. La mayor cantidad de nitrógeno se encuentra en la atmósfera (78.1%), sin embargo, no es asimilable por las plantas, lo que hace necesario el uso de fertilizantes nitrogenados para obtener una mejor producción de los cultivos. Estos fertilizantes nitrogenados provienen de combustibles fósiles, que al descomponerse liberan óxidos de nitrógeno los cuales son 292 veces más activos que el dióxido de carbono como gases de efecto invernadero. Además, los fertilizantes nitrogenados contribuyen en la eutrofización de los mantos acuíferos (Ferguson *et al.*, 2010). El nitrógeno de la atmósfera puede convertirse en un nutriente asimilable para las plantas a través de la fijación biológica, proceso que solo células procariontas han desarrollado. La propiedad de fijar nitrógeno se encuentra en dos grupos principales de bacterias: *Frankia* que se asocian con especies de varias familias vegetales, y *rhizobia*, las cuales se asocian con especies de la familia *Fabaceae*, comúnmente conocidas como leguminosas. El proceso de fijación biológica del nitrógeno ocurre en estructuras especializadas localizadas en las raíces de las plantas, llamadas nódulos (Franche *et al.*, 2009). Las *Fabaceae* son la tercera familia más grande de plantas con flores que incluye diversas especies distribuidas alrededor del mundo (Doyle & Luckow, 2003). En la interacción simbiótica entre *rhizobia* y miembros de *Fabaceae*, las bacterias convierten el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio, que es la forma asimilable de este elemento para las plantas. Esta capacidad de establecer simbiosis con *rhizobia* brinda a las leguminosas una ventaja sobre las otras especies de plantas (Roy *et al.*, 2020).

La interacción entre *rhizobia* y las leguminosas inicia cuando las raíces exudan a la rizósfera flavonoides (metabolitos secundarios), que a su vez inducen un efecto quimiotáctico sobre las *rhizobia* hacia los ápices de los pelos radicales. Además, los flavonoides activan en las bacterias la síntesis y la secreción de lipoquitooligosacáridos conocidos como factores de nodulación (FN). Los FN son percibidos por receptores específicos ubicados en la membrana plasmática del

ápice de los pelos radicales, lo que activa una cascada de señalización que permite la infección por *rhizobia* y la formación de nódulos (Mortier *et al.*, 2012). En presencia de las bacterias, el ápice de los pelos radicales se enrosca y éstas quedan atrapadas en una cámara de infección, a partir de la cual se generan los hilos de infección (HI) (Roy *et al.*, 2020). Los HI son estructuras tubulares que permiten el acceso de las bacterias hacia las células corticales de la raíz, en donde se inicia la formación del primordio de nódulo. Una vez que los HI llegan a la zona cortical de la raíz, las bacterias se liberan hacia las células de los primordios de nódulos por medio de un proceso similar a la endocitosis. Dentro del nódulo maduro, las bacterias son rodeadas por una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal (Oldroyd & Downie, 2008; Roy *et al.*, 2020; Serova *et al.*, 2018). Finalmente, las bacterias se diferencian a bacteroides y forman estructuras llamadas simbiosomas, dentro de las cuales los bacteroides fijan el nitrógeno atmosférico (Oldroyd & Downie, 2008).

Esta simbiosis requiere de una estricta regulación molecular, la cual involucra diversos genes, tanto de la planta como de la bacteria (Genre & Russo, 2016). Varios estudios farmacológicos han evidenciado la participación de las fosfolipasas D (FLDs) en la simbiosis *rhizobia*-leguminosas (Charron *et al.*, 2004; M. Den Hartog *et al.*, 2001; Martine Den Hartog *et al.*, 2003). Las FLDs son enzimas que hidrolizan los fosfolípidos (FL) de la membrana plasmática y generan ácido fosfatídico (AF), el cual está involucrado en diversos procesos celulares incluyendo señales transmembranales (Y. J. Kim *et al.*, 2015; Shiozaki *et al.*, 2015), señalizaciones vía hormonas (Grange *et al.*, 2000; T. Kalachova *et al.*, 2013; Katagiri *et al.*, 2005; Yao & Xue, 2018; Jian Zhao, 2015), producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Nakano *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2004) y rearreglo del citoesqueleto (N. Lian *et al.*, 2021; Pleskot *et al.*, 2010, 2013).

La importancia de la señalización hormonal (Cheng *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2018; G. Zhang *et al.*, 2021), la generación de EROs (Arthikala *et al.*, 2017; Cárdenas *et al.*, 2008; Cárdenas & Quinto, 2008; Montiel *et al.*, 2012) y el rearreglo del citoesqueleto (Cárdenas *et al.*, 1998; Gavrin *et al.*, 2015; G. Zhang *et*

al., 2021), en el establecimiento de la simbiosis *rhizobia*-leguminosas, ha sido reportada.

Las funciones de las FLDs en la simbiosis leguminosas-*rhizobia* ha sido escasamente estudiada. En un estudio reciente, se observó que la acumulación de transcritos del gen que codifica la fosfolipasa *GmFLD α 1* de soya (*Glycine max* L.) incrementa en los nódulos maduros en comparación con plantas control. Además, la disminución y la sobreexpresión de dicho gen generaron cambios en el rearrreglo del citoesqueleto de actina, en los niveles de hormonas y también en el número de nódulos formados (G. Zhang *et al.*, 2021). En un análisis previo en el grupo de trabajo, se observó que uno de los genes que codifican FLDs (*FLD α 2*) presenta mayor acumulación de transcritos en nódulos maduros (14 y 21 días posteriores a la inoculación con *Rhizobium tropici*), que en raíces no inoculadas (trabajo en preparación). Teniendo en cuenta estos resultados preliminares, es de nuestro interés investigar las funciones de *FLD α 2* en la simbiosis de *P. vulgaris* con la bacteria fijadora de nitrógeno *R. tropici*.

2. Planteamiento del problema

El nitrógeno es un componente esencial en las plantas, formando parte de procesos fisiológicos como la producción de hojas, tallo, estimulación del crecimiento de la raíz, entre otros (Leghari *et al.*, 2016). La disponibilidad del nitrógeno en suelos es limitada y para compensar esta deficiencia, se utilizan fertilizantes nitrogenados, los cuales son altamente contaminantes (Roy *et al.*, 2020). La fijación biológica de nitrógeno es una alternativa al uso de estos fertilizantes nitrogenados. La familia *Fabaceae* es capaz de establecer una relación simbiótica con bacterias específicas del suelo llamadas *rhizobia*, formando órganos especializados en sus raíces, en donde ocurre la fijación biológica de nitrógeno proporcionando este elemento a la planta (Ferguson *et al.*, 2010). Esta asociación simbiótica requiere de una estricta regulación a nivel molecular y celular, la cual involucra diversos genes, tanto de la planta como de la bacteria, entre ellos los genes que codifican las FLDs.

3. Justificación

Las fosfolipasas (FL) representan una familia ubicua de proteínas que hidrolizan los enlaces ésteres de los fosfolípidos, lo que contribuye a la homeostasis y estabilidad de las membranas. Las fosfolipasas pueden clasificarse en tres grandes clases: fosfolipasas D (FLD), fosfolipasas C (FLC), y fosfolipasas A (FLA), dependiendo de sus sitios de hidrólisis en los fosfolípidos correspondientes. Las FLDs hidrolizan fosfolípidos estructurales en la membrana produce AF el cual participa en funciones celulares muy importantes. Las funciones de las FLDs en la simbiosis leguminosas-*rhizobia* ha sido escasamente estudiada, es por esto que los resultados obtenidos en este trabajo contribuirán a ampliar los conocimientos sobre la participación de las FLDs en la regulación de la simbiosis mutualista entre leguminosas y *rhizobia*.

4. Marco teórico

4.1. Simbiosis *PvFLD α 2* -leguminosas

Las plantas, como organismos sésiles fotosintetizadores, son importantes proveedores de energía para los ecosistemas donde viven, en los cuales pueden formar asociaciones con microorganismos. El tipo de asociación que forman las plantas con los microorganismos contribuye a su desarrollo, supervivencia, diversidad, abundancia y mejoramiento del ecosistema (Van Der Heijden *et al.*, 2008). Entre estas asociaciones se encuentran las mutualistas, en las cuales las plantas proveen con nutrientes a los microorganismos mientras que estos potencializan el desarrollo de la planta, además, de actuar como controladores biológicos contra patógenos (Hardoim *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2013). Una de las interacciones benéficas más estudiadas es la simbiosis *rhizobia*-leguminosas; en esta simbiosis las bacterias *rhizobia* convierten el nitrógeno atmosférico (N₂) en amonio, la forma nitrogenada asimilable en plantas, lo cual promueve su desarrollo. Por su parte, las plantas proveen fuentes de carbono y otros nutrientes importantes para la viabilidad de *rhizobia* (Roy *et al.*, 2020; Zaidi *et al.*, 2017).

La interacción *rhizobia*-leguminosas tiene una estricta especificidad que depende de la estructura de los FN. Los FN están compuestos de un esqueleto de quitina con un ácido graso unido al azúcar terminal no reductor. Las modificaciones en la estructura del ácido graso cambian entre especies de *rhizobia*. Estas modificaciones varían entre el largo y grado de saturación del ácido graso, lo que contribuye a la especificidad entre la bacteria y la planta huésped. Modificaciones en esta estructura genera ineficiencia en la infección por *rhizobia*, por ejemplo, una mutante de *Sinorhizobium meliloti* o de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, que produjeron FN sin el grupo acetil, causaron deficiencias en la infección (Oldroyd & Downie, 2008). Por otro lado, los motivos de lisina del receptor *NFR1* también son importantes en el reconocimiento de los FN. Un estudio reciente mostró que dos motivos en el dominio LysM1 de *NFR1*, en *Lotus japonicus* L. permite diferenciar entre los FN y quitina (un elicitador inmunogénico) (Bozsoki *et al.*, 2020).

La importancia ecológica de las leguminosas está dada, en parte, por la capacidad de obtener nitrógeno de la interacción simbiótica con *rhizobia*. Las leguminosas incluyen especies de importancia agronómica como frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), soya (*Glycine max* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.) y lenteja (*Lens culinaris* L.) (Clúa *et al.*, 2018). Muchas de estas especies han sido utilizadas como modelos experimentales para estudiar los mecanismos que regulan la simbiosis con *rhizobia*. Actualmente se conocen varios de los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en el establecimiento de dicha simbiosis.

4.2. Mecanismos moleculares que regulan la simbiosis *rhizobia*-leguminosas

Uno de estos mecanismos moleculares que intervienen en el establecimiento de la simbiosis *rhizobia*-leguminosas, incluye la llamada “vía simbiótica común” (VSC). Este mecanismo también se activa durante la interacción de hongos micorrízicos arbusculares con las raíces de las leguminosas. La VSC comprende un grupo de proteínas entre las que se encuentran, *NFR1*, *NFR5*, *HMGR1* y *SYMRK*, las cuales transducen la señal inducida por los FN hacia el citoplasma. Los receptores *NFR1* y *NFR5* perciben los FN, junto con el receptor tipo cinasa *SYMRK*, que actúa como

correceptor de los FN. La enzima HMGR1 (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa 1) se une a SYMRK y activa la síntesis de mevalonato en el citoplasma. Un segundo grupo de proteínas que participan en la vía de señalización común, incluyen el complejo de proteínas que conforman parte de los poros nucleares, NP133, NUP85, NENA, la bomba de Ca^{2+} MCA8, y los canales de potasio CASTOR y POLLUX. La función de las nucleoporinas NUP85, NUP133 y NENA en la transducción de señales y su conexión con el conjunto anterior de proteínas de la VSC, aún está en estudio. MCA8, induce oscilaciones de Ca^{2+} junto con los canales de potasio CASTOR y POLLUX. El último grupo de proteínas participantes en este proceso, CCaMK y CYCLOPS, junto con los factores de transcripción NIN, NSP1, NSP2 y RAM1 se encuentran en el nucleoplasma. CCaMK, es una nucleasa cinasa dependiente de calcio y calmodulina y se postula que es activada por las oscilaciones de Ca^{2+} , fosforilando a CYCLOPS. Finalmente, CYCLOPS activa factores transcripcionales y de esta manera regula la expresión de genes esenciales para establecimiento de la simbiosis (Genre & Russo, 2016; Roy *et al.*, 2020).

Además de lo descrito anteriormente, se sabe de otros mecanismos moleculares que participan en la regulación de la simbiosis *rhizobia*-leguminosas. Por ejemplo, se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (EROs), las fitohormonas y los rearrreglos del citoesqueleto cumplen funciones importantes en el desarrollo adecuado de dicha interacción simbiótica.

1.1.1. Especies reactivas de oxígeno (EROs) en la simbiosis *rhizobia*-leguminosas

Las EROs son reguladores esenciales en diferentes procesos biológicos, incluyendo: el crecimiento de las plantas, el ciclo celular, la muerte celular programada, la señalización por hormonas, y el desarrollo y respuesta a estrés biótico y abiótico (Mittler *et al.*, 2004). Las interacciones planta-patógeno inician con una cascada de señalización, entre ellas, la vía de respuesta hipersensible (RH) la cual activa la muerte celular programada, que a su vez genera la acumulación de superóxido, peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo; a esta respuesta se le conoce como “explosión oxidativa” (Camejo *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la

producción de EROs, durante las respuestas de defensa de las plantas, es regulada por las FLDs tanto en etapas iniciales como tardías (Yamaguchi *et al.*, 2005). Las EROs también juegan un papel importante en las etapas tempranas y maduras en la simbiosis *rhizobia*-leguminosas. Por ejemplo, en frijol común se observó un incremento rápido y transitorio de las EROs en los ápices de los pelos radicales en respuesta a FN específicos (Cárdenas *et al.*, 2008; Cárdenas & Quinto, 2008). En esta misma especie, el silenciamiento del gen *PvRbohB* redujo significativamente los eventos de infección por *R. tropici* e indujo la formación de nódulos deficientes en la fijación de nitrógeno (Arthikala *et al.*, 2017; Montiel *et al.*, 2012).

1.1.2. Hormonas en la interacción simbiótica *rhizobia*-leguminosas

Otras moléculas de señalización como: ácido abscísico (ABA), auxinas, etileno, ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y brasinoesteroides (BR), son esenciales para la regulación de diferentes procesos de las plantas tales como: germinación, crecimiento y desarrollo, respuesta a estrés abiótico e interacciones planta-microorganismo (Pacheco & Quinto, 2022). ABA tiene un efecto regulador negativo en la nodulación, por ejemplo, en la simbiosis de *M. truncatula* con *S. meliloti*, el tratamiento con ABA indujo una reducción en el número de nódulos (Ding *et al.*, 2008). Respecto a las auxinas, se sabe que su acumulación es localizada y necesaria para el desarrollo apropiado del nódulo (J. Li & Wang, 2019). Por otro lado, el etileno es un regulador negativo de la nodulación, por ejemplo, mutantes de *M. truncatula* insensibles a etileno mostraron hipernodulación (Larrainzar *et al.*, 2015).

El ácido salicílico (AS) es una fitohormona con un papel importante en la inducción del sistema de resistencia adquirido (SRA) (Jian Zhao, 2015). Se ha documentado que el AS es modulado por las FLDs (Janda *et al.*, 2015; T. A. Kalachova *et al.*, 2012; Krinke *et al.*, 2009). La relación entre el AS y las FLDs ha sido reportado en la simbiosis *rhizobia*-soya, donde la sobreexpresión del gen *GmPLD α 1* va acompañada de un descenso en los niveles de AS y metil-AS, mientras que el

silenciamiento del mismo gen incrementa los niveles de AS y metil-AS (G. Zhang *et al.*, 2021). El AS podría ser un regulador negativo en la nodulación.

Por otro lado, se ha reportado que el ácido jasmónico es un regulador negativo en la simbiosis *rhizobia*-leguminosas. En soya los niveles de AJ, metil-jasmonato (MeJA) y jasmonil-L-isolucina (JA-Ile) decrecen en plantas con sobreexpresión del gen *GmPLD α 1*, sin embargo, aumentan los niveles en plantas con silenciamiento del mismo gen (G. Zhang *et al.*, 2021). Otras hormonas que tienen un efecto regulatorio en dicha simbiosis son los brasinoesteroides (BR). Estas hormonas tienen un papel positivo en el desarrollo de nódulos indeterminados, por ejemplo, mutantes de *M. truncatula* en el receptor de BR (BRI1) desarrollan menos nódulos, de menor tamaño y deficientes en la fijación de nitrógeno que el control (Cheng *et al.*, 2017). Sin embargo, en soya, que desarrolla nódulos determinados, el tratamiento con BR exógeno reduce el número de nódulos pero incrementa su tamaño (Yan *et al.*, 2018).

1.1.3. Reorganización del citoesqueleto en la interacción *rhizobia*-leguminosas

El citoesqueleto de las plantas está compuesto principalmente por filamentos de actina (F-actina) que a su vez está formado por monómeros de actina (G-actina), y microtúbulos, los cuales se dividen en heterodímeros de tubulina α/β (Pleskot *et al.*, 2013). Durante la simbiosis en *P. vulgaris* se observó que existen cambios en el rearrreglo de los microfilamentos de actina minutos después del tratamiento con FN específicos (Cárdenas *et al.*, 1998) y durante el proceso de infección y maduración de los nódulos *M. truncatula* (Gavrin *et al.*, 2015). La regulación de la dinámica de actina durante la nodulación fue recientemente reportada en soya. En esta especie se observó que la sobreexpresión del gen *GmPLD α 1* redujo la cantidad de filamentos de actina e incrementó la densidad de los mismos en las raíces transgénicas durante la infección con *rhizobia* (G. Zhang *et al.*, 2021).

1.1.4. Regulación de los lípidos durante la simbiosis

Numerosos lípidos participan en la regulación de la función celular y adaptación a estrés en distintos organismos. Se ha reportado que los lípidos de membrana como fosfolípidos y galactolípidos son fundamentales en el desarrollo y crecimiento de las células (Hong *et al.*, 2016). La síntesis de lípidos en la membrana de plantas huésped es esencial en la simbiosis *rhizobia*-leguminosa. Esta simbiosis conlleva al desarrollo de un nuevo órgano, los nódulos, en cuyo interior las bacterias quedan rodeadas de una membrana de origen vegetal. La formación de esta nueva membrana, en conjunto con las de las células que forman parte de los nódulos, involucra la activación del metabolismo lipídico. En los nódulos de soya se encontró que hay menor biosíntesis de ácidos grasos que en raíces, sin embargo, la biosíntesis de fosfolípidos es más activa en nódulos que en raíces (G. Zhang *et al.*, 2020). Esto sugiere que el metabolismo lipídico es esencial durante la nodulación.

Las proteínas transportadoras de lípidos (LTPs), constituyen una familia de proteínas de plantas que se unen y transportan diferentes lípidos. Las LTPs facilitan el transporte de fosfolípidos, galactolípidos y ácidos grasos libres (Edqvist *et al.*, 2018; Wei & Zhong, 2014), así como el transporte de polímeros lipídicos en el espacio apoplástico y en la pérdida de pared celular (Edqvist *et al.*, 2018). Las funciones de las LTPs durante la simbiosis se han reportado en varios trabajos. En *M. truncatula* se observó que la función de una LTP, la MtN5, es indispensable para la formación del primordio de nódulo y para el rearrreglo de la membrana durante la formación de los hilos de infección (Pii *et al.*, 2009, 2012, 2013). En frijol común se observó que varios genes que codifican LTPs cambian su expresión durante las etapas tempranas y tardías de la nodulación. Particularmente, se observó que dos de estos genes disminuyeron su expresión durante las etapas tardías de la nodulación (14, 21 y 30 dpi), mientras que cuatro incrementaron su expresión en etapas tempranas y tardías (7, 14 y 30 dpi) (Fonseca-García *et al.*, 2021).

Aunque, los mecanismos moleculares que regulan la simbiosis *rhizobia*-leguminosas se han estudiado con detalle, aún no se esclarecen en su totalidad.

Hay estudios con enfoques fisiológicos que han puesto en evidencia la participación de las FLDs en las vías de señalización inducidas corriente abajo de la percepción de los FN. En un trabajo reciente en nódulos de soya, se reportó una mayor activación de la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos en comparación con la raíz (G. Zhang *et al.*, 2020). Por otra parte, en la misma leguminosa se observó que el silenciamiento del gen *GmFLDα1* incrementa el número de nódulos, y regula la dinámica del citoesqueleto de actina, así como se eleva la expresión de genes reguladores de las etapas tempranas de la nodulación y los niveles de algunas hormonas (G. Zhang *et al.*, 2021). Estos resultados sugirieron que las FLDs tienen un papel importante en la interacción *rhizobia*-leguminosas.

4.3. Fosfolipasas D

Las fosfolipasas (FL) representan una familia ubicua de proteínas que hidrolizan los enlaces ésteres de los fosfolípidos, lo que contribuye a la homeostasis y estabilidad de las membranas (Singh *et al.*, 2012; Takáč *et al.*, 2019). Las fosfolipasas pueden clasificarse en tres grandes clases: fosfolipasas D (FLD), fosfolipasas C (FLC), y fosfolipasas A (FLA), dependiendo de sus sitios de hidrólisis en los fosfolípidos correspondientes (Takáč *et al.*, 2019).

Los miembros de la subfamilia de las FLDs se han identificado en varias especies de plantas como: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (G. Li *et al.*, 2007), arroz (*Oryza sativa* L.) (Qin & Wang, 2002) y soya (Jiangzhe Zhao *et al.*, 2012), en las que hay 12, 17 y 18 genes que codifican FLDs, respectivamente. Acorde a la estructura de los genes, la similitud en la secuencia proteica, en los dominios estructurales y en la relación filogenética, las FLDs de *Arabidopsis* se agrupan en seis clases: α , β , γ , ϵ , δ y ζ (Qin & Wang, 2002; Xuemin Wang, 2005). Las FLDs también se pueden clasificar en tres subfamilias: C2-PLDs, PX/PH-PLD y SP-PLDs según la presencia o no de dominios de unión a fosfolípidos en el extremo N terminal. Las C2-PLD presentan un dominio de unión Ca^{2+} y fosfolípidos y las PX/PH-PLD presentan dos dominios de interacción con fosfolípidos (PX/PH: *phox* *homology*/*Pleckstrin Homology*) (Pacheco & Quinto, 2022). Por su parte, las SP-PLDs presentan un

péptido señal en el extremo N terminal. Sólo una SP-PLDs ha sido identificada, la cual está codificada en el genoma de arroz (G. Li *et al.*, 2007).

Las FLDs se localizan en la membrana plasmática, se expresan de manera ubicua tanto en células procariotas como eucariotas, y presentan propiedades bioquímicas, regulatorias y estructurales distintivas. Estas enzimas hidrolizan fosfolípidos estructurales en la membrana, tales como fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatilglicerol (FG) (Ruelland *et al.*, 2015) (Figura 1). La actividad hidrolítica de las FLDs produce AF el cual participa en funciones celulares muy importantes. Por ejemplo, el AF induce un incremento en la densidad de filamentos de actina e influye en el ensamblaje y estabilidad de los mismos (Pleskot *et al.*, 2010, 2013). Además, la FLD α 1 es un componente importante en la regulación del complejo de proteínas G (Roy Choudhury & Pandey, 2016), las cuales a su vez, regulan diferentes mecanismos de respuestas en las plantas (H. Lian *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2018).

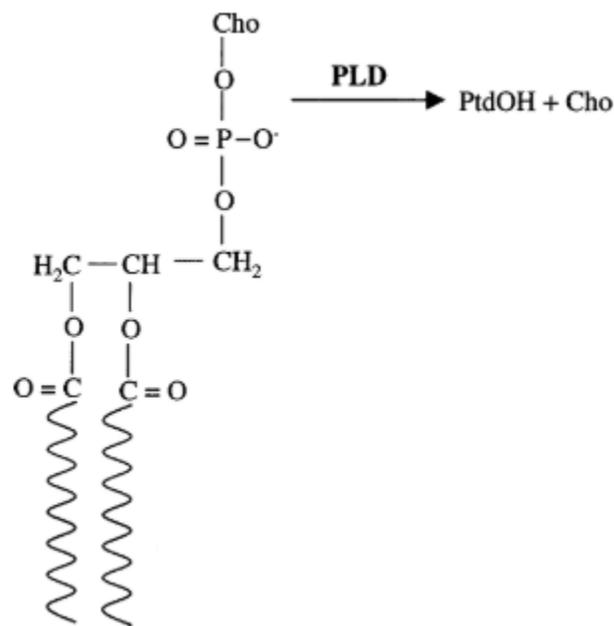


Figura 1. Hidrolisis de fosfatidilcolina (PtdCho) realizada por FLD (PLD) y sus respectivos productos. PtdOH, ácido fosfatídico. Cho, colina (X Wang, 2001).

La participación de las FLDs en la respuesta a estrés abiótico ha sido ampliamente estudiada. En *Arabidopsis*, se observó que las bajas temperaturas incrementan la actividad de las FLDs, afectando los niveles de AF en el citoplasma (Muzi *et al.*, 2016). En esta misma especie, se encontró que la FLD δ participa en la regulación de la dinámica de los microtúbulos y en el movimiento estomático en la respuesta a shock térmico, así como en una vía dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Song *et al.*, 2020). En condiciones de estrés hídrico en el naranjo dulce “Pineapple”, se observó un incremento en la actividad de varias FLDs (β , α , γ , δ , ζ) (Alferez *et al.*, 2020).

En la interacción planta-microorganismos, las FLDs también cumplen funciones importantes. Se ha reportado que el AF participa en las respuestas contra patógenos a través de la regulación de vías de señalización mediadas por ácido abscísico (García-Andrade *et al.*, 2020), auxinas (Gao *et al.*, 2013), etileno (Han *et al.*, 2010), ácido jasmónico (Nakano *et al.*, 2013), ácido salicílico (Jian Zhao *et al.*, 2013) y brasinoesteroides (Schlöffel *et al.*, 2020). En cuanto a la participación de las FLDs en la simbiosis *rhizobia*-leguminosa, se sabe que los FN la activan las FLDs (Martine Den Hartog *et al.*, 2003). Además, el tratamiento con Mas7, un tetradecapéptido aislado del veneno de avispa que actúa como agonista de los FN (Pingret *et al.*, 1998), estimula la actividad de las FLDs (M. Den Hartog *et al.*, 2001). En *M. truncatula* Gaertn., se observó que el promotor de *ENOD11*, un gen reportero de señalización que se induce por los FN, se activa debido al tratamiento con Mas7 (Charron *et al.*, 2004). Dichos reportes sugieren la participación de FLDs en las respuestas a la percepción de los FN.

Como ya se ha mencionado, en trabajos más recientes, se ha reportado que la sobreexpresión del gen *GmFLD α 1* de soya disminuye (70%) en el número de nódulos por peso seco de la raíz, en comparación con el control (G. Zhang *et al.*, 2021). Mientras que el silenciamiento de dicho gen incrementó (33%) el número de nódulos. Además, la actividad de la nitrogenasa aumentó significativamente en plantas con sobreexpresión y silenciamiento de *GmFLD α 1*, mientras que disminuyó en las líneas control. Por otra parte, se reportó que los niveles de ácido salicílico,

ácido jasmónico y jasmonoil-isoleucina disminuyeron debido a la sobreexpresión del gen *GmFLDα1* e incrementaron debido al silenciamiento. Los niveles de ácido abscísico, aumentaron debido a la sobreexpresión de *GmFLDα1* y disminuyeron debido al silenciamiento (G. Zhang *et al.*, 2021).

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Analizar, mediante genética reversa, la función del gen *PvFLDα2* en la simbiosis de *Phaseolus vulgaris* L. con *Rhizobium tropici*.

5.2. Objetivos específicos

- 1.1.1. Analizar la morfología y el número de los nódulos formados en raíces *P. vulgaris* con silenciamiento de *PvFLDα2*: RNAi a los 14 dpi con *R. tropici*.
- 1.1.2. Cuantificar los nódulos formados en las raíces de *P. vulgaris* con silenciamiento de *PvFLDα2* a los 21 dpi.
- 1.1.3. Medir la actividad de la nitrogenasa en los nódulos de las raíces con silenciamiento de *PvFLDα2* e inoculadas con *R. tropici* (21 dpi).

6. Hipótesis

Las plantas leguminosas participan en la asociación simbiótica mutualista con micorrizas y *rhizobia*. La simbiosis *rhizobia*-leguminosa tiene como objetivo fijar el nitrógeno atmosférico para las plantas a cambio de esqueletos de carbono. La simbiosis es un proceso de desarrollo complejo, los genes esenciales del huésped para el establecimiento de la simbiosis se están estudiando ampliamente. En los últimos años ha sido estudiado el papel que desempeña la familia de las fosfolipasas durante la simbiosis *rhizobia*-leguminosa, sin embargo, se sabe poco del rol que ejerce la fosfolipasa Dα2 en etapas tempranas de la simbiosis entre *Rhizobium tropici* y frijol común (*P. vulgaris*). La fosfolipasa Dα2 tiene un efecto regulador negativo en el desarrollo y funcionamiento de los nódulos en *P. vulgaris*. Por medio de genética reversa se analizó la morfología en nódulos de 14 dpi y 21 dpi con *R.*

tropici, además de la medición de la actividad de la nitrogenasa en nódulos a 21 dpi con *R. tropici*, arrojando datos que apoyan dicha hipótesis.

7. Materiales y métodos

7.1. Generación de raíces transgénicas

Para generar raíces transgénicas en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. var. Negro Jamapa, se desinfectaron semillas mediante un lavado de cinco minutos con hipoclorito de sodio 25% V/V, seguido por un lavado con agua estéril tres veces para eliminar restos de hipoclorito. Se continúa con un lavado de un minuto con alcohol etílico industrial y finalmente con un lavado con agua estéril tres veces para eliminar los restos de alcohol. Las semillas se colocaron en charolas metálicas previamente esterilizadas (20 min a 120° C y 150 kPa.), cubiertas con papel aluminio y con una capa de papel absorbente humedecido con agua estéril (Fig. 1A); las semillas se incubaron a 28°C por 48 horas (Fig. 1B).

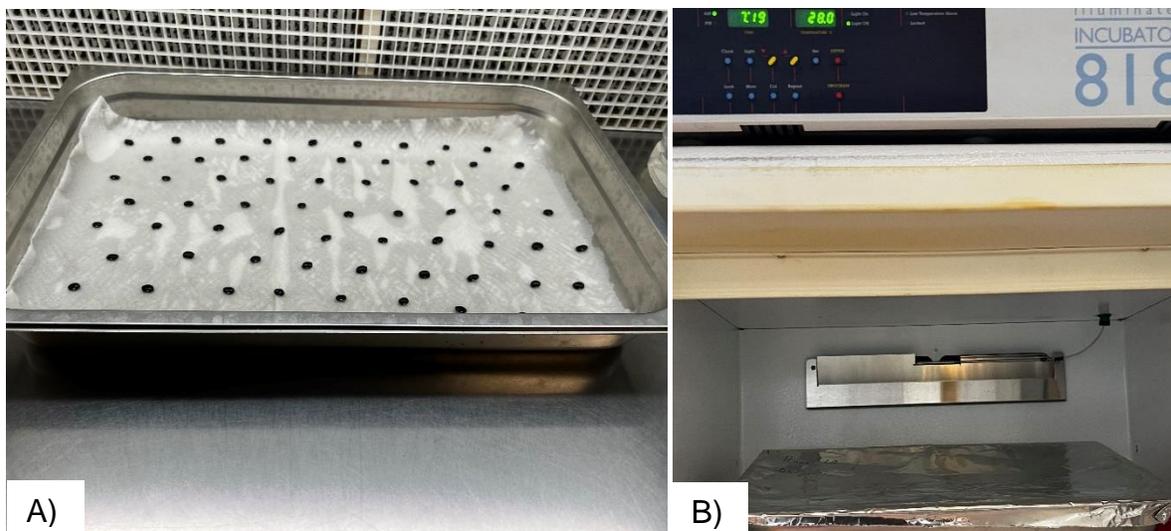


Figura 2. Germinación de semillas de frijol. A) Semillas de *P. vulgaris* var. Negro Jamapa en charola metálica previamente esterilizado sobre una capa de papel absorbente humedecido con agua estéril. B) Charolas en incubadora (Precision Scientific 818 Low Temperature Illuminated Incubator) a 28°C por 48 horas.

Dos cepas de *Agrobacterium rhizogenes* K599 transformadas cada una con la construcción para el silenciamiento de *PvFLD α 2* (*PvFLD α 2:RNAi*). Para la construcción de RNAi, se generó mediante la clonación de fragmentos exclusivos de la secuencia codificante de *PvFLD α 2* resultando en el vector pTDT-RNAi-1773 con 11,855 pb. Como control se utilizó el vector pTdT-DC-SAC, que lleva una secuencia truncada e irrelevante de *A. thaliana* pre-mir159. Se seleccionaron dos clonas (C1 y C2), estas cepas presentaron 71 % y 69 % de disminución en la acumulación de transcritos de *PvFLD α 2*, respectivamente. Posteriormente, se infectaron plántulas de dos días después de la germinación (dpg) a las cuales se les realizó una herida en la raíz debajo del cotiledón; sobre la herida se colocó una asada de las clona de *A. rhizogenes* K599 portadora de las construcciones C1 y C2, y la cepa control (SAC) (Fig. 2). Las plantas se mantuvieron en medio B & D estéril sin nitrógeno hasta que se observó la emergencia de las raíces transgénicas en la zona de la herida (10 a 12 días después de la herida) (Anexo 1A). Las raíces transgénicas (portadoras del vector pTdT-DC-SAC o *PvFLD α 2:RNAi*) se observaron bajo el microscopio de epifluorescencia (Olympus SZX7) descartando las raíces que no mostraran fluorescencia (Anexo 1B). Este proceso de infección se realizó acorde al protocolo descrito por Estrada-Navarrete *et al.*, (2007) con algunas modificaciones (Fonseca-García *et al.*, 2021).



Figura 3. Semillas de *P. vulgaris* var. Negro Jamapa infectadas con las clonas de *A. rhizogenes* K599 portadora de las construcciones C1 y C2, y la cepa control (SAC).

A los 12 días después de la infección, las raíces transgénicas se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia. Luego de eliminadas las raíces no fluorescentes, las plantas se colocaron en macetas con vermiculita estéril y se inocularon con *Rhizobium tropici* CIAT 899 WT (OD₆₀₀ 0.05) o *R. tropici* portadora del gen reportero β -glucuronidasa (*R. tropici*-GUS) (Jefferson *et al.*, 1987) (OD₆₀₀ 0.05) (Fig. 3). Las plantas inoculadas se regaron con solución B & D (Broughton & Dilworth, 1971) (Tabla 1) sin nitrógeno y las plantas no inoculadas se trataron adicionalmente con 2 mM KNO₃ y 1.6 mM (NH₄)₂ SO₄ para evitar infección por *rhizobia*.



Figura 4. Plantas de *P. vulgaris* var. Negro Jamapa 12 días después de la infección con *Rhizobium tropici* CIAT 899 WT (OD₆₀₀ 0.05) o *R. tropici* portadora del gen reportero β -glucuronidasa y colocadas en macetas con vermiculita estéril.

Tabla 1. Composición de la solución B & D.

Solución		Molaridad Final (μ M)	Fórmula
A	Ca	1000	CaCl ₂ · 2H ₂ O
B	P	500	KH ₂ PO ₄
C	Fe	10	Fe citrate
D	Mg	250	MgSO ₄ · 7H ₂ O
	K	1500	K ₂ SO ₄

	Mn	1	MnSO ₄ · H ₂ O
	B	2	H ₃ BO ₄
	Zn	0.5	ZnSO ₄ · 7H ₂ O
	Cu	0.2	CuSO ₄ · 5H ₂ O
	Co	0.1	CoSO ₄ · 7H ₂ O
	Mo	0.1	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O

7.2. Análisis del fenotipo de nódulos en raíces transgénicas

Para determinar si la disminución de la expresión de *PvFLDa2* afecta la formación y el desarrollo de los nódulos, estos se cuantificaron en dos etapas diferentes de la nodulación, a los 14 y a los 21 dpi, en raíces portadoras de la construcción para el silenciamiento o con el vector control. A los 14 dpi, el conteo de nódulos se realizó en raíces inoculadas con *R. tropici*-GUS. Para la cuantificación de los nódulos en esta etapa, éstos se clasificaron en las siguientes categorías: I) nódulos simples (nódulos esféricos individuales), II) nódulos dobles (dos nódulos no separados), III) nódulos triples (tres nódulos no separados), IV) más de tres nódulos (tres o más nódulos unidos) (Fig. 4A). Además, se midió el diámetro de estos nódulos a los 14 dpi mediante el software Fiji ImageJ (9.9) (Schindelin *et al.*, 2012). La tinción de la β - glucosidasa (GUS) se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Barrera-Ortiz *et al.*, (2022) pasando 5 min por la solución I de lavado, posteriormente se retira y reemplaza con la solución II de lavado por 5 min, se retira y reemplaza por X-Gluc (100mM) e incuba a 37°C en la oscuridad por 60 min (Fig. 4B). Para la clarificación de los nódulos, el tejido se embebió en etanol al 20 % y ácido clorhídrico al 2 %, y se incubó a 60°C durante 2 h. Posteriormente, el tejido se rehidrató con una serie de distintas concentraciones de etanol (etanol absoluto, 80 %, 60%, 40 %, 20 %, 10 %) cada 20 min. Finalmente, el tejido de las raíces transgénicas se almacenó en glicerol al 50% para la cuantificación posterior de los nódulos (Anexo 2A). A los 21 dpi se contaron los nódulos en raíces inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 (Anexo 2B). Estas raíces son de las mismas plantas que se utilizaron para la

medición de la fijación de nitrógeno (Sección 3). Tanto a los 14 como a los 21 dpi, la cuantificación se realizó por planta.

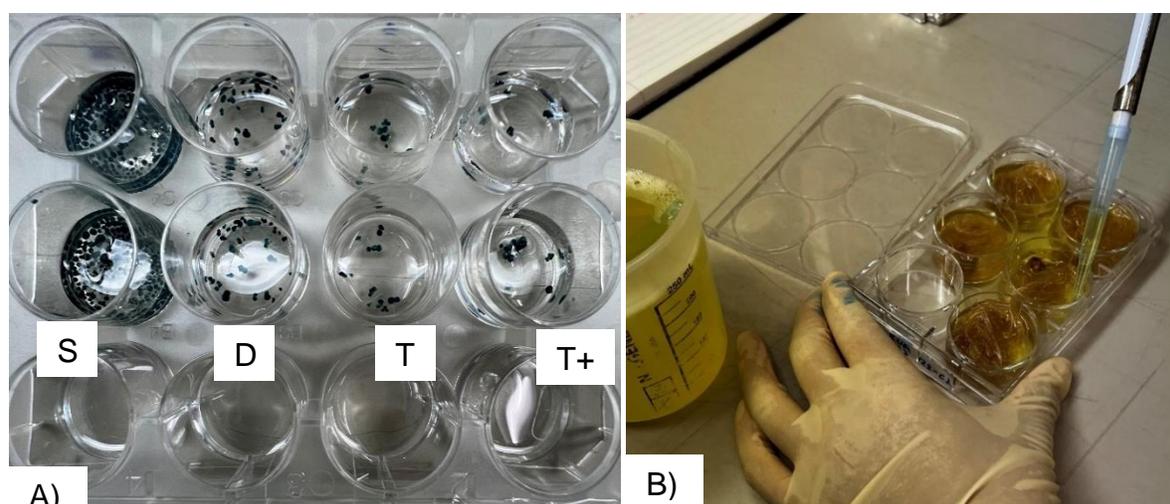


Figura 5. Raíces de *P.vulgaris* a 14 dpi. A) Clasificación de nódulos a 14 dpi teñidos con β - glucosidasa (GUS). Nódulos simples (S), nódulos dobles (D), nódulos triples (T) y más de tres nódulos (T+). B) Tinción de β - glucosidasa (GUS) en raíces de *P.vulgaris* a 14 dpi.

Tabla 2. Composición de la solución X-Gluc.

	Componente	Volumen total (10 ml)	Molaridad final
X-Gluc	K ₂ HPO ₄	0.615 ml	100 mM
	KHPO ₄	0.385 ml	100 mM
	EDTA	200 μ l	10 mM
	Triton X	10 μ l	0.1 mM

5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt (C ₁₄ H ₁₃ BrClNO ₇)	K ₃ Fe(CN) ₆	50 µl	0.5 mM
	K ₄ Fe(CN) ₆	50 µl	0.5 mM
	X-gluc	100 µl	1 mM
	H ₂ O destilada	8.59 ml	--

7.3. Análisis de actividad de la nitrogenasa

Con el objetivo de saber si la disminución de la expresión de *PvFLDα2* afecta la actividad de la nitrogenasa, se midió la capacidad de reducción de acetileno (Vessey, 1994) en nódulos de 21 dpi de raíces transgénicas que portan la construcción *PvFLDα2*:RNAi o pTDT-SAC. Para ello, las raíces con nódulos maduros (21 dpi) inducidos por *R. tropici* CIAT 899 WT, se observaron mediante el microscopio de epifluorescencia (Olympus SZX7) para eliminar las raíces no transformadas con los respectivos vectores. Posteriormente estas raíces se colocaron en viales de vidrio (160 ml) y se sellaron con tapones de goma. Luego, con una jeringa, se extrajeron 2 ml de aire y se inyectó la misma cantidad de acetileno. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, se midió la reducción de acetileno en un cromatógrafo de gases (modelo Varian 3300), de acuerdo a lo descrito previamente (Ramírez *et al.*, 1999). Finalmente, los nódulos se retiraron de la raíz y se deshidrataron a 60°C (Anexo 3A), asimismo las raíces se secaron y pesaron (Anexo 3B). La actividad de la nitrogenasa se expresó como µmol de etileno h⁻¹ nódulo de peso seco⁻¹.

7.4. Análisis estadístico

Los datos experimentales generados, incluyendo el conteo de nódulos a 14 y 21 dpi, y la actividad de la nitrogenasa fueron analizados usando GraphPad Prism 8 versión 8.0.2 (263) (San Diego, California USA, www.graphpad.com) y RStudio

4.1.2 con el paquete *tydediverse* (Wickham et al., 2019), usando la simulación de Montecarlo con 9999 remuestreos sin reemplazamientos con el 95% de confianza.

8. Resultados

En un análisis previo en el grupo de trabajo, se observó que uno de los genes que codifican FLDs (*FLD α 2*) presenta mayor acumulación de transcritos en nódulos maduros (14 y 21 dpi con *Rhizobium tropici*), que en raíces no inoculadas (trabajo en preparación). Teniendo en cuenta estos resultados preliminares, se seleccionaron dos cepas de *Agrobacterium rhizogenes* K599 transformadas cada una con la construcción para el silenciamiento de *PvFLD α 2* (*PvFLD α 2;RNAi*). Estas cepas (C1 y C2) presentan un 71 % y 69 % de disminución en la acumulación de transcritos de *PvFLD α 2*. A partir de esto, surge nuestro interés en investigar las funciones de *FLD α 2* en la simbiosis de *P. vulgaris* con la bacteria fijadora de nitrógeno *R. tropici* observando las diferencias morfológicas presentadas en los nódulos a 14 y 21 dpi, además de los cambios en la fijación de nitrógeno.

8.1. Número de nódulos en raíces transgénicas

La cuantificación de los nódulos se realizó a los 14 y 21 dpi en raíces transformadas con las cepas C1 y C2 y SAC. A los 14 dpi, el número de nódulos se cuantificó en plantas inoculadas con *R. tropici*-GUS. En esta etapa de la nodulación, se observó que el número promedio de nódulos en las raíces transformadas con las clonas C1 y C2 es mayor que en las raíces control, incluyendo las cuatro categorías de nódulos analizadas (Fig. 5A, 6A, 7A, 8A). Sin embargo, esta diferencia observada entre las raíces transformadas con las clonas C1 y C2, y con el control, solo es significativa ($p \leq 0.05$) para los nódulos de las categorías simples y dobles (Fig. 5B, C y 6B, C).

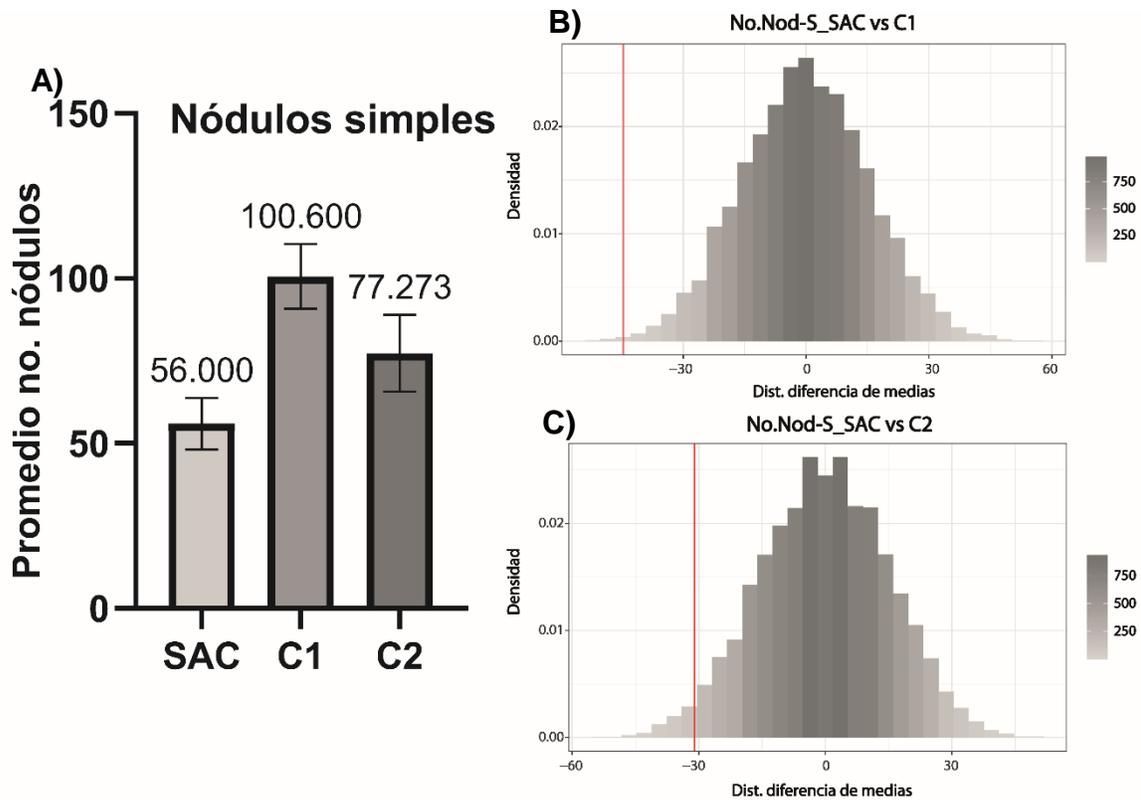


Figura 6. Comparación del número promedio de nódulos simples en raíces transgénicas de *P. vulgaris* a 14 dpi inoculadas con *R. tropici*-GUS. A) Número promedio de nódulos simples en plantas control (SAC) y plantas con silenciamiento de *PvFLDa2* (C1 y C2). B) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C1 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $**P = 0.0033$). C) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C2 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $*P = 0.0145$).

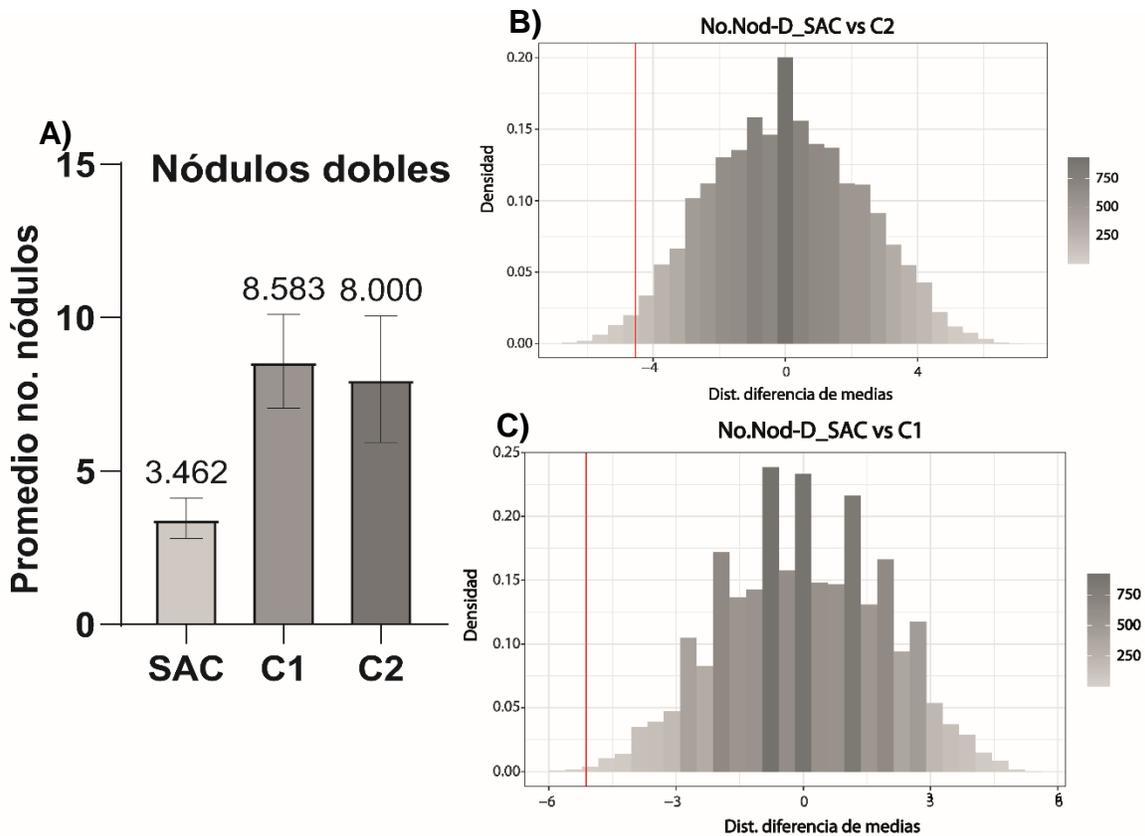


Figura 7. Comparación del número promedio de nódulos dobles en raíces transgénicas de *P. vulgaris* a 14 dpi inoculadas con *R. tropici*-GUS. A) Número promedio de nódulos dobles en plantas control (SAC) y plantas con silenciamiento de *PvFLDa2* (C1 y C2). B) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C1 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $**P = 0.0029$). C) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C2 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $*P = 0.0342$).

Aunque el número promedio de nódulos triples y múltiples es mayor que en las raíces control, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Fig. 7B, C y 8B, C).

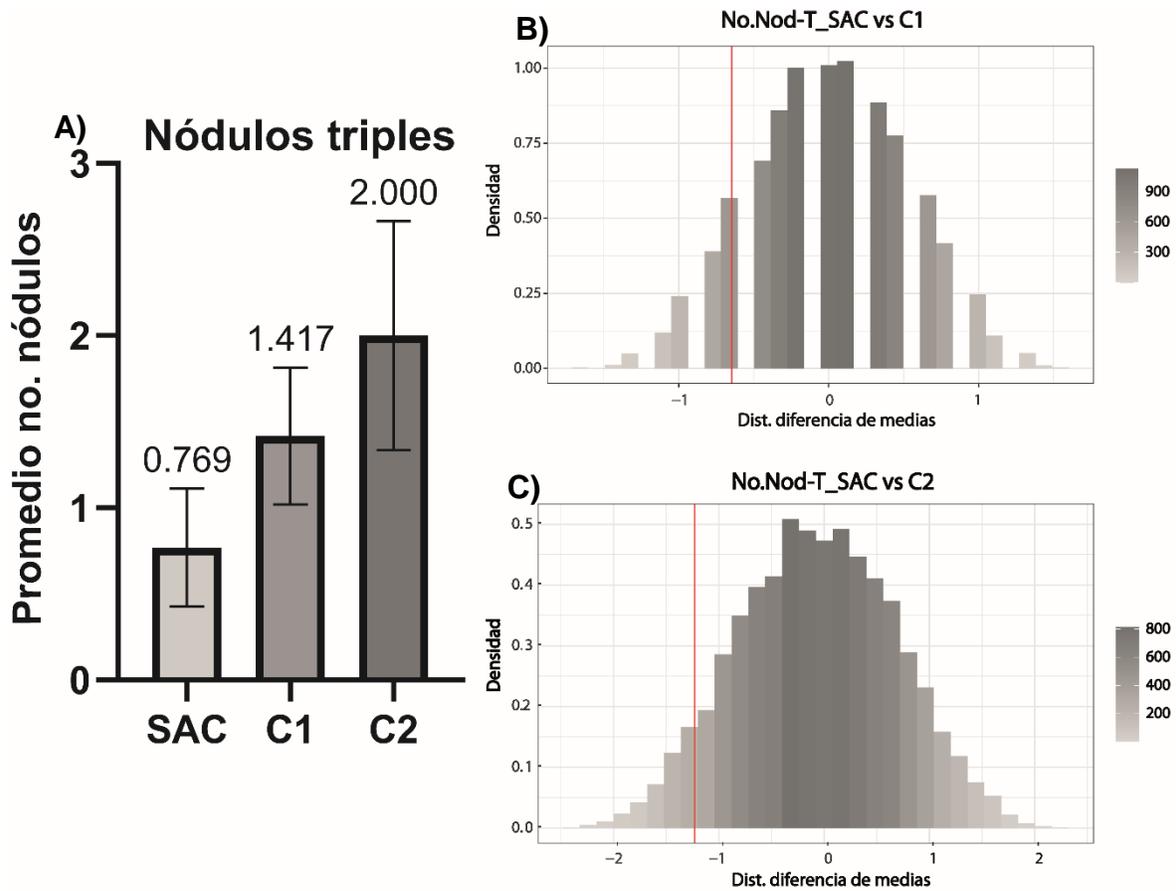


Figura 8. Comparación del número promedio de nódulos triples en raíces transgénicas de *P. vulgaris* a 14 dpi inoculadas con *R. tropici*-GUS. A) Número promedio de nódulos triples en plantas control (SAC) y plantas con silenciamiento de *PvFLDa2* (C1 y C2). B) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C1 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $P = 0.185$). C) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C2 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $P = 0.0875$).

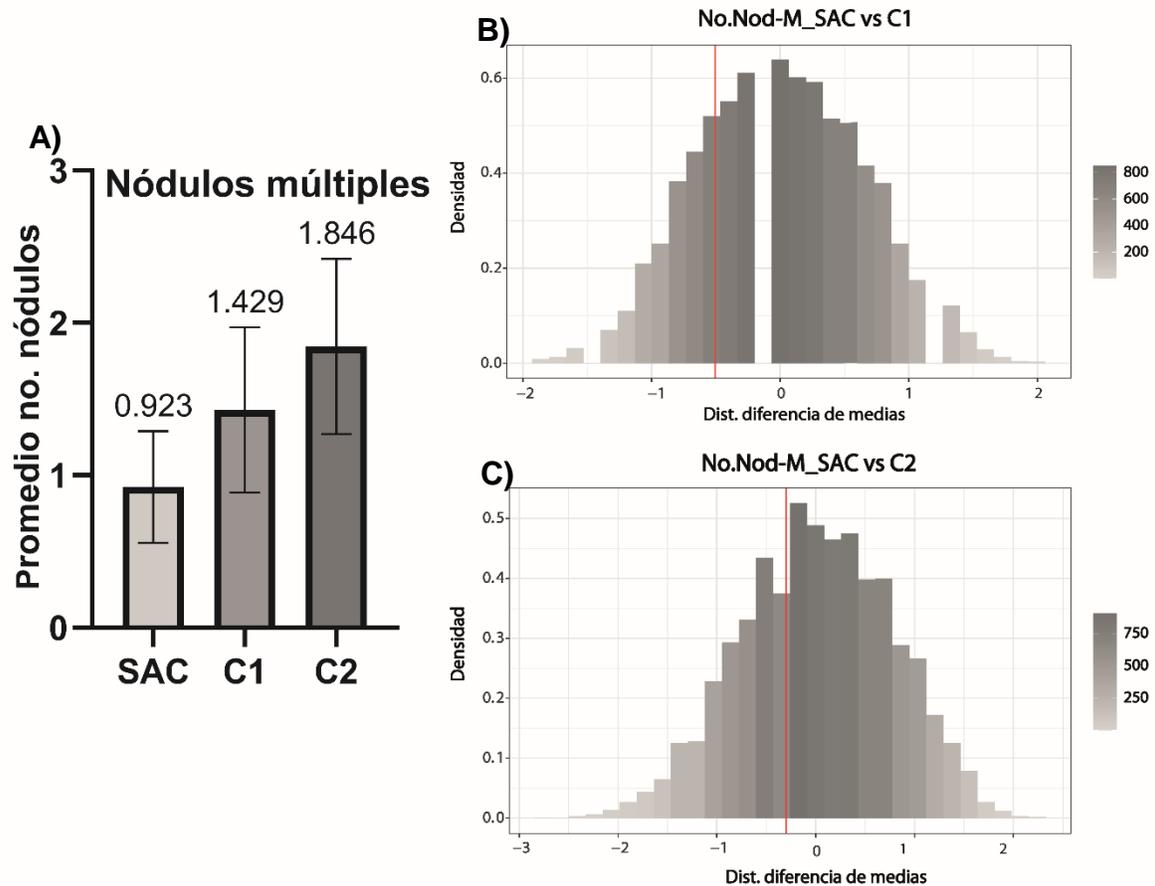


Figura 9. Comparación del número promedio de nódulos múltiples en raíces transgénicas de *P. vulgaris* a 14 dpi inoculadas con *R. tropici*-GUS. A) Número promedio de nódulos múltiples en plantas control (SAC) y plantas con silenciamiento de *PvFLDα2* (C1 y C2). B) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C1 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $P = 0.4615$). C) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C2 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $P = 0.4665$).

La cuantificación de los nódulos se hizo también a los 21 dpi en plantas inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 WT. En esta etapa de la nodulación, se observó que el número promedio de nódulos en raíces transformadas con las clonas C1 y C2 es ligeramente mayor que en las plantas control (Fig. 9A). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 9B y C).

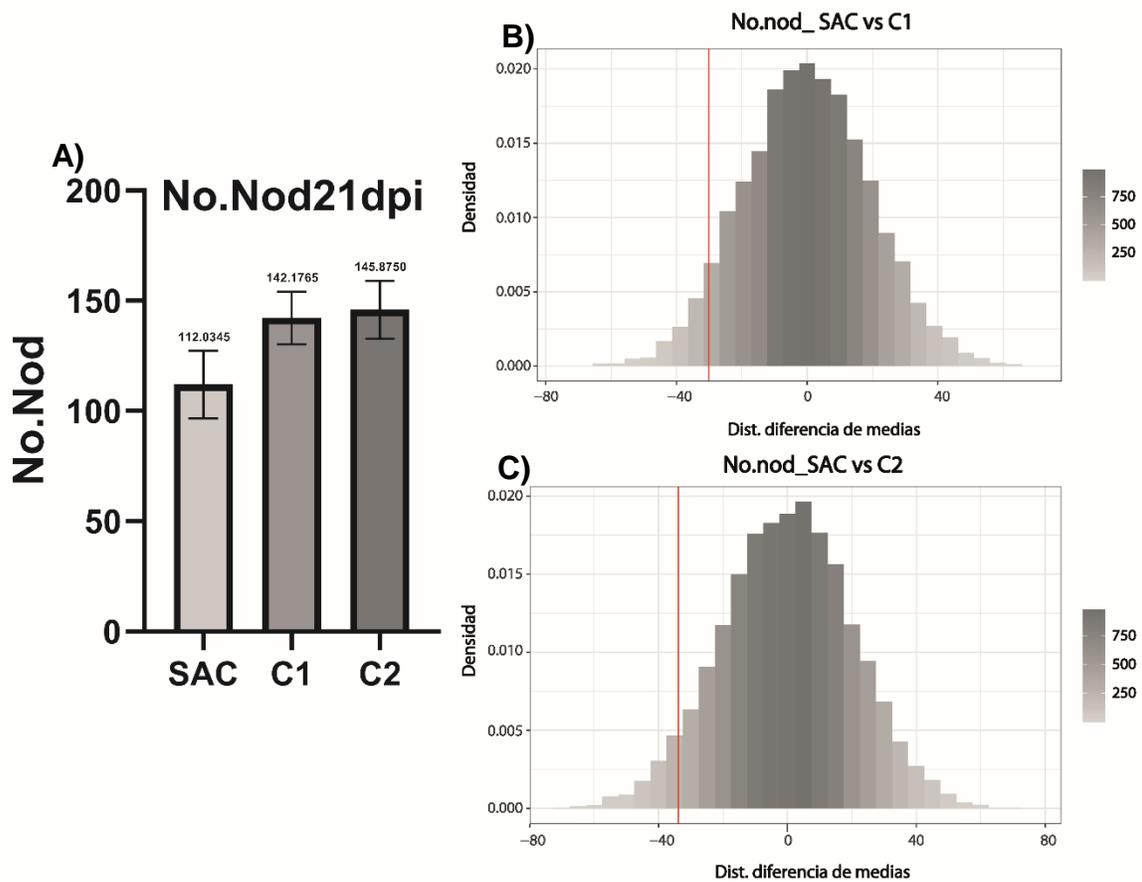


Figura 10. Comparación del número promedio de nódulos en raíces transgénicas de *P. vulgaris* a 21 dpi inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 WT. A) Número promedio de nódulos en plantas control (SAC) y plantas con silenciamiento de *PvFLDα2* (C1 y C2). B) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C1 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $P = 0.12$). C). Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C2 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $P = 0.09$).

8.2. Análisis de la actividad de la nitrogenasa

La actividad de la nitrogenasa se midió mediante la cuantificación de la capacidad de reducción de acetileno de nódulos a los 21 dpi en raíces silenciadas y en raíces control. Los resultados mostraron que la capacidad de reducción de acetileno no

cambió de manera significativa entre raíces silenciadas y en raíces control (Fig. 6A). Sin embargo, se observó un ligero incremento de la reducción de acetileno en las raíces silenciadas respecto a las raíces control, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa (Fig. 6B y C).

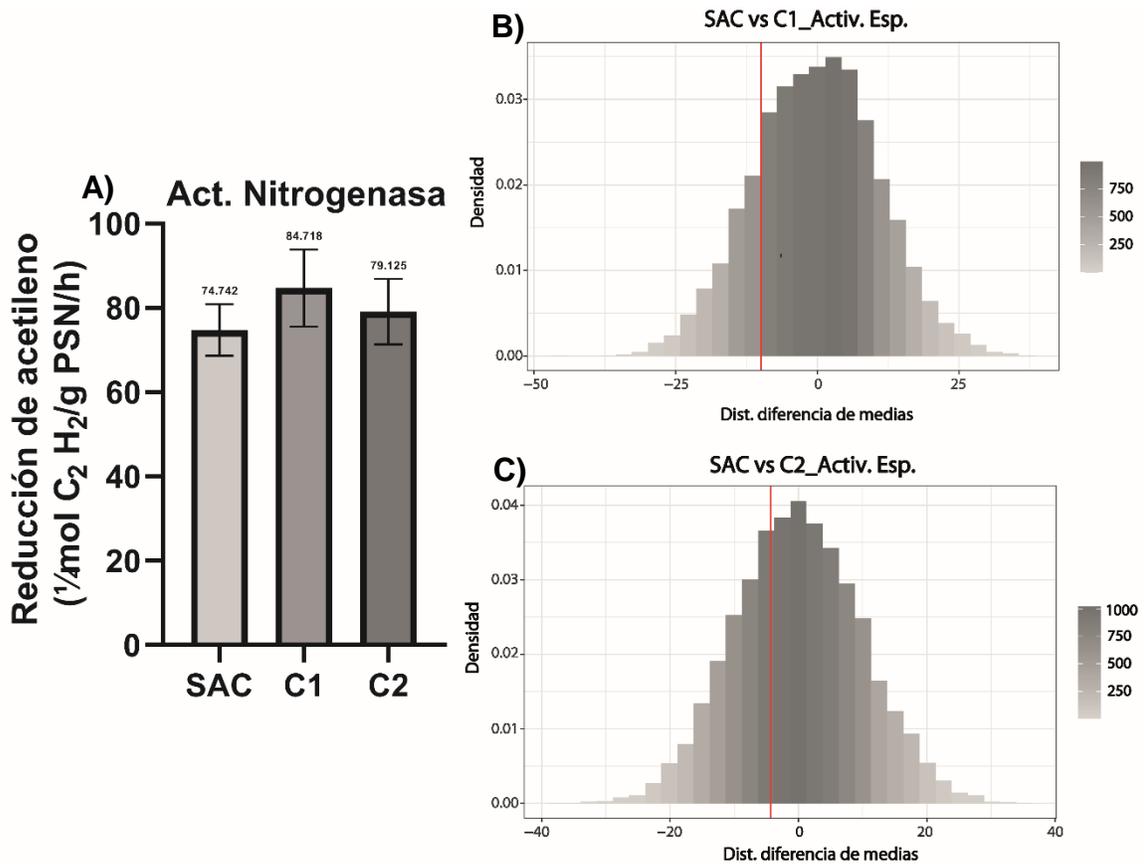


Figura 11. Promedio de la reducción de acetileno en nódulos de raíces transgénicas de *P. vulgaris* a 21 dpi inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 WT. A) Reducción de acetileno en nódulos de plantas control (SAC) y plantas con silenciamiento de *PvFLD α 2* (C1 y C2). B) Distribución de la diferencia entre las medias de SAC y C1 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $P = 0.3723$). C) Distribución de la diferencia entre la media de SAC y C2 obtenidas mediante una simulación de Montecarlo (9999 remuestreos, $P = 0.6637$).

9. Discusión

Con el objetivo de analizar si el silenciamiento del gen *PvFLD α 2* tiene un efecto importante en el desarrollo de nódulos en frijol, se cuantificaron y clasificaron los nódulos a 14 dpi, encontrando que hay cuatro categorías (ver sección 3). Los resultados obtenidos mostraron que las raíces con silenciamiento de *PvFLD α 2* produjeron más nódulos que las raíces control, en las cuatro categorías de nódulos analizadas (Fig. 5A, 6A, 7A, 8A), sin embargo, en las categorías de nódulos triples y múltiples, el promedio de número de nódulos con respecto a SAC no fue estadísticamente significativo ya que al realizar la simulación de Montecarlo el valor de probabilidad resultó en 0.0875 y 0.4665, respectivamente. Esto puede deberse al tamaño de muestras obtenidas, ya que los nódulos triples y múltiples no se encontraban con una frecuencia similar a los nódulos simples y dobles. En el mismo sentido, en relación a la cuantificación de nódulos a los 21 dpi, los resultados mostraron que con el silenciamiento del gen *PvFLD α 2* aumentó el número de nódulos en plantas inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 WT a diferencia de las plantas control (Fig. 9A). Resultados similares fueron reportados por Zhang *et al.* (2021), donde encontraron que el silenciamiento del gen *GmPLD α 1* aumentó en un 33% el número de nódulos por peso seco de raíz en soya. Sin embargo, es pertinente comentar que estos autores realizaron la cuantificación de nódulos entre 28 dpi por peso seco de raíz, lo cual difiere de la metodología realizada en este trabajo (además, es conveniente recordar que dichos experimentos fueron realizados en soya donde la maduración de los nódulos se lleva a cabo a los 28 dpi). Otro aspecto importante es que Zhang *et al.* (2021) analizaron el gen *GmPLD α 1* y en este trabajo se analizó el gen *PvFLD α 2* de frijol, que es más cercano filogenéticamente al *GmPLD α 2* de soya. En este contexto, hay que señalar que a pesar de la diferencia entre la metodología y los modelos usados, así como el gen estudiado, en ambos trabajos se observó que el silenciamiento de dichos genes incrementa el número de nódulos. Estos resultados sugieren que las FLDs de la subfamilia α son reguladores importantes del número de nódulos. Con respecto al fenotipo anormal de nódulos observados a los 14 dpi, éste podría estar relacionado

con la remodelación de lípidos. Se ha documentado que las FL juegan un papel importante en la remodelación de los lípidos de la membrana, funcionando como reguladores clave de la organización de las endomembranas, controlando además, la organización y la dinámica del citoesqueleto (Bargmann & Munnik, 2006; Pleskot *et al.*, 2013).

En relación a la actividad de la nitrogenasa, los resultados obtenidos a los 21 dpi en frijol, indican que esta actividad aumenta ligeramente en las raíces silenciadas en el gen *PvFLD α 2*. En cambio los resultados reportados por Zhang *et al.*, 2021 indican que la actividad de la nitrogenasa aumentó significativamente en raíces con silenciamiento de *GmPLD α 1*. Esto sugiere que el gen *PvFLD α 2* podría estar involucrado en la fijación de nitrógeno en nódulos de *P. vulgaris*, ya que al disminuir la expresión de este gen se induce un ligero incremento en la tasa de fijación de nitrógeno (Fig. 10A), sin embargo se tendrían que realizar más experimentos para comprobar o descartar esta propuesta.

Por otro lado, en la investigación realizada por Zhang *et al.*, 2021, estos autores muestran que los niveles hormonales durante el silenciamiento del gen *GmPLD α 1*, específicamente los niveles de ácido abscísico, disminuyen un 10% en comparación con las raíces control. Se sabe que el ácido abscísico (ABA) regula la respuesta al estrés abiótico y está relacionada en la interacción planta-microbio (Charpentier & Oldroyd, 2013; Ding *et al.*, 2008; T. H. Kim *et al.*, 2011). La participación de las FLDs está involucrada en respuesta a ABA junto con la proteína fosfatasa 2C (PP2C), también conocida como ABI1 (G. Zhang *et al.*, 2021). Se ha reportado que *FLD α 1* y su producto (AF) en *Arabidopsis* regula PP2C, ABI1, el cual es un regulador negativo en la respuesta a ABA (W. Zhang *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se propone un modelo (Fig. 11) de los posibles papeles de *PvFLD α 2* en la vía de señalización mediada por ABA en la simbiosis *rhizobia*-frijol.

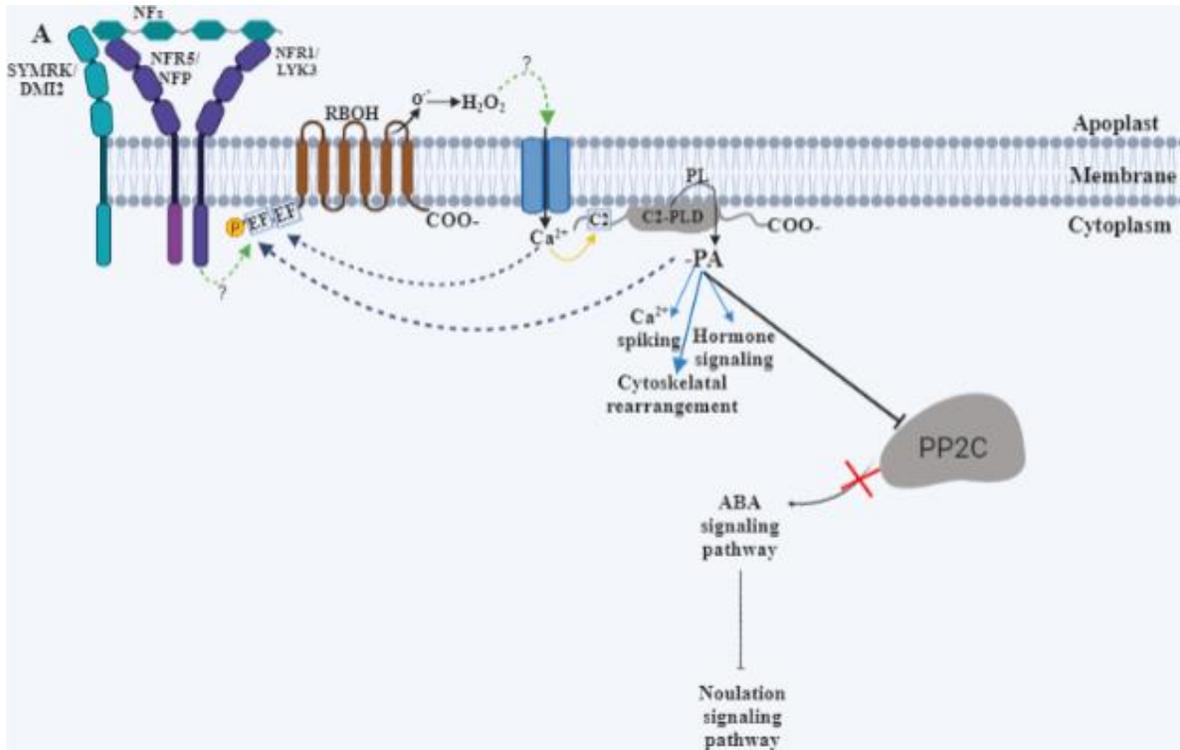


Figura 12. Modelo propuesto sobre la participación de *FLD α 2* en la regulación de la formación de nódulos durante la simbiosis *rhizobia*-frijol. Se propone que el dominio cinasa de *NFR1* fosforila RBOH, lo que incrementaría su actividad liberando el anión superóxido, convirtiéndose en peróxido de hidrógeno. El incremento de Ca^{2+} se ha propuesto que es inducido por EROs (Cárdenas & Quinto, 2008), activando C2-FLD, el cual se encuentra unido a la membrana. El AF liberado por C2-FLD regula diversos procesos celulares importantes, entre ellos la inhibición de la proteína fosfatasa 2C (PP2C), regulador negativo de la respuesta a ABA. La fitohormona ABA juega un papel negativo en la nodulación (Pacheco & Quinto, 2022).

Este modelo propuesto podría explicar el fenotipo del incremento del número de nódulos tras el silenciamiento del gen *PvFLD α 2* (Fig. 5A, 6A, 7A, 8A), debido a la inhibición de la vía de señalización de ABA. La *FLD α 2* involucrada en la formación de nódulos durante la simbiosis *rhizobia*-frijol podría jugar un papel importante en la vía de señalización de ABA, iniciando con el dominio cinasa de *NHR1* fosforilando a RBOH, incrementando así la actividad de esa proteína integrada en la membrana

liberando el anión superóxido y posteriormente convirtiéndose en peróxido de hidrógeno. Después existe un incremento de Ca^{2+} se ha propuesto que es inducido por EROs (Cárdenas & Quinto, 2008), activando C2-FLD, el cual se encuentra unido a la membrana. El AF liberado por C2-FLD regula diversos procesos celulares importantes, entre ellos la inhibición de la proteína fosfatasa 2C (PP2C), regulador negativo de la respuesta a ABA. Mencionado lo anterior, al estar presente el silenciamiento del gen *PvFLD α 2*, existe una menor cantidad de AF, lo que genera una mayor concentración de PP2C aumentando la inhibición de la producción ABA, disminuyendo así dicha hormona, esto provoca una mayor nodulación en la raíces que presentan el silenciamiento del gen *PvFLD α 2*. De igual manera, el silenciamiento del gen *PvFLD α 2* podría afectar el recambio de fosfolípidos membranales induciendo un desarrollo alterado de los nódulos. Tomando en cuenta que los nódulos son un órgano nuevo, existe un constante recambio de fosfolípidos.

10. Conclusiones

Las funciones de las FLDs durante la simbiosis leguminosas-*rhizobia* ha sido escasamente estudiada. En *P. vulgaris* se sabe poco del rol que ejerce la fosfolipasa *D α 2* en etapas tempranas de la simbiosis con *Rhizobium tropici*. Por ello, se analizó la morfología, el número de los nódulos y la actividad de la nitrogenasa en raíces de *P. vulgaris* inoculados con *R. tropici* a los 14 dpi y 21 dpi mediante el silenciamiento del gen *PvFLD α 2*.

El silenciamiento del gen *PvFLD α 2* durante la simbiosis de *P. vulgaris* y *R. tropici*, resultó en cambios morfológicos irregulares en los nódulos formados, así como en un aumento en el número de ellos en raíces inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 o GUS, durante las diferentes etapas, sin embargo, no se observaron cambios significativos en la actividad de la nitrogenasa entre las raíces silenciadas y las raíces SAC. Estos resultados sugieren que el gen *FLD α 2* podría estar involucrado en la regulación inicial del proceso de la simbiosis *rhizobia*-leguminosa. Además, proponemos, que el gen *FLD α 2* puede estar implicado en el recambio de fosfolípidos de la membrana en distintos estadios de la nodulación, debido a las

formaciones irregulares que presentaron los nódulos tras el silenciamiento de este gen, y en la vía de señalización por ABA. No obstante harían falta experimentos para comprobar o descartar esta hipótesis.

11. Bibliografía

- Alferez, F., Wu, J., & Graham, J. H. (2020). Phospholipase D (PLD) response to water stress in citrus roots and leaves. *Agronomy*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010045>
- Arthikala, M., Montiel, J., Sánchez-López, R., Nava, N., Gourion, B., & Laboratoire, U. M. R. (2017). *Respiratory Burst Oxidase Homolog Gene A Is Crucial for Rhizobium Infection and Nodule Maturation and Function in Common Bean*. *8*(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02003>
- Bargmann, B. O. R., & Munnik, T. (2006). The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, *9*(5), 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.011>
- Barrera-Ortiz, S., López-García, C. M., Ortiz-Castro, R., Guevara-García, Á. A., & López-Bucio, J. (2022). Bacterial Quorum-Sensing Signaling-Related *drp1* Mutant Influences Abscisic Acid Responsiveness in *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*(1), 376–390. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10302-9>
- Bozsoki, Z., Gysel, K., Hansen, S. B., Lironi, D., Krönauer, C., Feng, F., de Jong, N., Vinther, M., Kamble, M., Thygesen, M. B., Engholm, E., Kofoed, C., Fort, S., Sullivan, J. T., Ronson, C. W., Jensen, K. J., Blaise, M., Oldroyd, G., Stougaard, J., ... Radutoiu, S. (2020). Ligand-recognizing motifs in plant LysM receptors are major determinants of specificity. *Science*, *369*(6504), 663–670. <https://doi.org/10.1126/science.abb3377>
- Broughton, W. J., & Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *The Biochemical Journal*, *125*(4), 1075–1080.

<https://doi.org/10.1042/bj1251075>

- Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á., & Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, *103*, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.035>
- Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F., & Quinto, C. (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant Journal*, *56*(5), 802–813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03644.x>
- Cárdenas, L., & Quinto, C. (2008). Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors. *Plant Signaling and Behavior*, *3*(12), 1101–1102. <https://doi.org/10.4161/psb.3.12.7004>
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P. K., & Quinto, C. (1998). Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium etli* Nodulation Signals. *Plant Physiology*, *116*(3), 871–877. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.871>
- Charpentier, M., & Oldroyd, G. E. D. (2013). Nuclear calcium signaling in plants. *Plant Physiology*, *163*(2), 496–503. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220863>
- Charron, D., Pingret, J. L., Chabaud, M., Journet, E. P., & Barker, D. G. (2004). Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link rhizobium nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca²⁺ spiking and specific ENOD gene expression. *Plant Physiology*, *136*(3), 3582–3593. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051110>
- Cheng, X., Gou, X., Yin, H., Mysore, K. S., Li, J., & Wen, J. (2017). Functional characterisation of brassinosteroid receptor MtBRI1 in *Medicago truncatula*. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09297-9>
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2018). Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/genes9030125>

- Den Hartog, M., Musgrave, A., & Munnik, T. (2001). Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: A role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant Journal*, *25*(1), 55–65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.00931.x>
- Den Hartog, Martine, Verhoef, N., & Munnik, T. (2003). Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells. *Plant Physiology*, *132*(1), 311–317. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017954>
- Dent, D., & Cocking, E. (2017). Establishing symbiotic nitrogen fixation in cereals and other non-legume crops: The Greener Nitrogen Revolution. *Agriculture and Food Security*, *6*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40066-016-0084-2>
- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J. F., Harris, J. M., & Oldroyd, G. E. D. (2008). Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, *20*(10), 2681–2695. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061739>
- Doyle, J. J., & Luckow, M. A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, *131*(3), 900–910. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018150>
- Edqvist, J., Blomqvist, K., Nieuwland, J., & Salminen, T. A. (2018). Plant lipid transfer proteins: Are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins? *Journal of Lipid Research*, *59*(8), 1374–1382. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083139>
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P. M., & Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, *2*(7), 1819–1824. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.259>
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(1), 61–76.

<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>

- Fonseca-García, C., Solis-Miranda, J., Pacheco, R., & Quinto, C. (2021). Non-specific Lipid Transfer Proteins in Legumes and Their Participation During Root-Nodule Symbiosis. *Frontiers in Agronomy*, 3(April), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fagro.2021.660100>
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1–2), 35–59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>
- Frink, C. R., Waggoner, P. E., & Ausubel, J. H. (1999). Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1175–1180.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1175>
- Gao, H. B., Chu, Y. J., & Xue, H. W. (2013). Phosphatidic acid (PA) Binds PP2AA1 to regulate PP2A activity and PIN1 polar localization. *Molecular Plant*, 6(5), 1692–1702. <https://doi.org/10.1093/mp/sst076>
- García-Andrade, J., González, B., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, P. L., & Vera, P. (2020). The role of aba in plant immunity is mediated through the pyr1 receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–22.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165852>
- Gavrin, A., Jansen, V., Ivanov, S., Bisseling, T., & Fedorova, E. (2015). ARP2/3-mediated actin nucleation associated with symbiosome membrane is essential for the development of symbiosomes in infected cells of *Medicago truncatula* root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(5), 605–614.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0402-R>
- Genre, A., & Russo, G. (2016). Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant–microbe interactions? *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00096>
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3), 872–877.

<https://doi.org/10.1104/pp.017004>

- Grange, M., Sette, C., Cuomo, M., Conti, M., Lagarde, M., Prigent, A. F., & Némoy, G. (2000). The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 is regulated by phosphatidic acid binding. Consequences for cAMP signaling pathway and characterization of a phosphatidic acid binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33379–33387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006329200>
- Han, L., Li, G. J., Yang, K. Y., Mao, G., Wang, R., Liu, Y., & Zhang, S. (2010). Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate Botrytis cinerea-induced ethylene production in Arabidopsis. *Plant Journal*, 64(1), 114–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04318.x>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Hong, Y., Zhao, J., Guo, L., Kim, S. C., Deng, X., Wang, G., Zhang, G., Li, M., & Wang, X. (2016). Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Progress in Lipid Research*, 62, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.002>
- Janda, M., Šašek, V., Chmelařová, H., Andrejch, J., Nováková, M., Hajšlová, J., Burketová, L., & Valentová, O. (2015). Phospholipase D affects translocation of NPR1 to the nucleus in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 6(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00059>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>
- Kalachova, T. A., Iakovenko, O. M., Kretinin, S. V., & Kravets, V. S. (2012). Effects of salicylic and jasmonic acid on phospholipase D activity and the level of active oxygen species in soybean seedlings. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 6(3), 243–248. <https://doi.org/10.1134/S1990747812030099>

- Kalachova, T., Iakovenko, O., Kretinin, S., & Kravets, V. (2013). Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. *Plant Physiology and Biochemistry*, *66*, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.006>
- Katagiri, T., Ishiyama, K., Kato, T., Tabata, S., Kobayashi, M., & Shinozaki, K. (2005). An important role of phosphatidic acid in ABA signaling during germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *43*(1), 107–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02431.x>
- Kim, T. H., Hauser, F., Ha, T., Xue, S., Böhmer, M., Nishimura, N., Munemasa, S., Hubbard, K., Peine, N., Lee, B. H., Lee, S., Robert, N., Parker, J. E., & Schroeder, J. I. (2011). Chemical genetics reveals negative regulation of abscisic acid signaling by a plant immune response pathway. *Current Biology*, *21*(11), 990–997. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.045>
- Kim, Y. J., Guzman-Hernandez, M. L., Wisniewski, E., & Balla, T. (2015). Phosphatidylinositol-Phosphatidic Acid Exchange by Nir2 at ER-PM Contact Sites Maintains Phosphoinositide Signaling Competence. *Developmental Cell*, *33*(5), 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.028>
- Krinke, O., Flemr, M., Vergnolle, C., Collin, S., Renou, J. P., Taconnat, L., Yu, A., Burketová, L., Valentová, O., Zachowski, A., & Ruelland, E. (2009). Phospholipase D activation is an early component of the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology*, *150*(1), 424–436. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133595>
- Larrainzar, E., Riely, B. K., Kim, S. C., Carrasquilla-Garcia, N., Yu, H. J., Hwang, H. J., Oh, M., Kim, G. B., Surendrarao, A. K., Chasman, D., Siahpirani, A. F., Penmetsa, R. V., Lee, G. S., Kim, N., Roy, S., Mun, J. H., & Cook, D. R. (2015). Deep sequencing of the *Medicago truncatula* root transcriptome reveals a massive and early interaction between nodulation factor and ethylene signals. In *Plant Physiology* (Vol. 169, Issue 1). <https://doi.org/10.1104/pp.15.00350>
- Leghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., HafeezLaghari, A.,

- MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., Bhutto, T. A., Wahocho, S. A., & Lashari, A. A. (2016). Role of Nitrogen for Plant Growth and Development : A review ces inEnvironmental Biology Role of Nitrogen for Plant Growth rowth and Development : A Review. *Advan Ces InEnvironmental Biology*, 10(9)(September), 209–218.
https://www.researchgate.net/publication/309704090_Role_of_Nitrogen_for_Plant_Growth_and_Development_A_review
- Li, G., Lin, F., & Xue, H. W. (2007). Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLDB1 in seed germination. *Cell Research*, 17(10), 881–894.
<https://doi.org/10.1038/cr.2007.77>
- Li, J., & Wang, X. (2019). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity. *Plant Science*, 279(May 2018), 45–50.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.021>
- Lian, H., Xu, P., He, S., Wu, J., Pan, J., Wang, W., Xu, F., Wang, S., Pan, J., Huang, J., & Yang, H. Q. (2018). Photoexcited CRYPTOCHROME 1 Interacts Directly with G-Protein β Subunit AGB1 to Regulate the DNA-Binding Activity of HY5 and Photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 11(10), 1248–1263. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.08.004>
- Lian, N., Wang, X., Jing, Y., & Lin, J. (2021). Regulation of cytoskeleton-associated protein activities: Linking cellular signals to plant cytoskeletal function. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 241–250. <https://doi.org/10.1111/jipb.13046>
- Liu, C., Xu, Y., Feng, Y., Long, D., Cao, B., Xiang, Z., & Zhao, A. (2019). Ectopic expression of mulberry G-proteins alters drought and salt stress tolerance in tobacco. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1).
<https://doi.org/10.3390/ijms20010089>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663.
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Rosana Sánchez-López, M.-K. A., Santana, O., Sánchez, F., & Quinto, C. (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by *Rhizobia*. 53(10), 1751–1767. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs120>
- Mortier, V., Holsters, M., & Goormachtig, S. (2012). Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 245–258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02406.x>
- Muzi, C., Camoni, L., Visconti, S., & Aducci, P. (2016). Cold stress affects H⁺-ATPase and phospholipase D activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.027>
- Nakano, M., Nishihara, M., Yoshioka, H., Takahashi, H., Sawasaki, T., Ohnishi, K., Hikichi, Y., & Kiba, A. (2013). Suppression of DS1 Phosphatidic Acid Phosphatase Confirms Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 8(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075124>
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Pacheco, R., & Quinto, C. (2022). Phospholipase Ds in plants: Their role in pathogenic and symbiotic interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 173(November 2021), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.01.025>
- Park, J., Gu, Y., Lee, Y., Yang, Z., & Lee, Y. (2004). Phosphatidic Acid Induces Leaf Cell Death in *Arabidopsis* by Activating the Rho-Related Small G Protein GTPase-Mediated Pathway of Reactive Oxygen Species Generation. *Plant Physiology*, 134(1), 129–136. <https://doi.org/10.1104/pp.103.031393>
- Pii, Y., Astegno, A., Peroni, E., Zaccardelli, M., Pandolfini, T., & Crimi, M. (2009).

- The *Medicago truncatula* N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(12), 1577–1587.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1577>
- Pii, Y., Molesini, B., Masiero, S., & Pandolfini, T. (2012). The non-specific lipid transfer protein N5 of *Medicago truncatula* is implicated in epidermal stages of rhizobium-host interaction. *BMC Plant Biology*, 12, 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-233>
- Pii, Y., Molesini, B., & Pandolfini, T. (2013). The involvement of *Medicago truncatula* non-specific lipid transfer protein N5 in the control of rhizobial infection. *Plant Signaling and Behavior*, 8(7), 6–10.
<https://doi.org/10.4161/psb.24836>
- Pingret, J., Journet, E., Barker, D. G., Biologie, L. De, & Umr, I. (1998). *Rhizobium Nod Factor Signaling : Evidence for a G Protein – Mediated Transduction Mechanism*. 10(May), 659–671.
- Pleskot, R., Li, J., Žárský, V., Potocký, M., & Staiger, C. J. (2013). Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends in Plant Science*, 18(9), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.005>
- Pleskot, R., Potocký, M., Pejchar, P., Linek, J., Bezvoda, R., Martinec, J., Valentová, O., Novotná, Z., & Žárský, V. (2010). Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton. *Plant Journal*, 62(3), 494–507.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04168.x>
- Qin, C., & Wang, X. (2002). The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD ζ 1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiology*, 128(3), 1057–1068.
<https://doi.org/10.1104/pp.010928>
- Ramírez, M., Valderrama, B., Arredondo-Peter, R., Soberón, M., Mora, J., & Hernández, G. (1999). *Rhizobium etli* genetically engineered for the heterologous expression of *Vitreoscilla* sp. hemoglobin: Effects on free-living and symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(11), 1008–1015.

<https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.1008>

- Roy Choudhury, S., & Pandey, S. (2016). The role of PLD α 1 in providing specificity to signal-response coupling by heterotrimeric G-protein components in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *86*(1), 50–61. <https://doi.org/10.1111/tpj.13151>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, *32*(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Ruelland, E., Kravets, V., Derevyanchuk, M., Martinec, J., Zachowski, A., & Pokotylo, I. (2015). Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environmental and Experimental Botany*, *114*, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.009>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlöffel, M. A., Salzer, A., Wan, W. L., van Wijk, R., Corvo, R. Del, Šemanjski, M., Symeonidi, E., Slaby, P., Kilian, J., Maček, B., Munnik, T., & Gust, A. A. (2020). The BIR2/BIR3-associated phospholipase DG1 negatively regulates plant immunity. *Plant Physiology*, *183*(5), 371–384. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01292>
- Serova, T. A., Tsyganova, A. V., & Tsyganov, V. E. (2018). Early nodule senescence is activated in symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) forming ineffective nodules blocked at different nodule developmental stages. *Protoplasma*, *255*(5), 1443–1459. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1246-9>
- Shiozaki, K., Takahashi, K., Hosono, M., Yamaguchi, K., Hata, K., Shiozaki, M., Bassi, R., Prinetti, A., Sonnino, S., Nitta, K., & Miyagi, T. (2015). Phosphatidic acid-mediated activation and translocation to the cell surface of sialidase NEU3, promoting signaling for cell migration. *FASEB Journal*, *29*(5), 2099–

2111. <https://doi.org/10.1096/fj.14-262543>

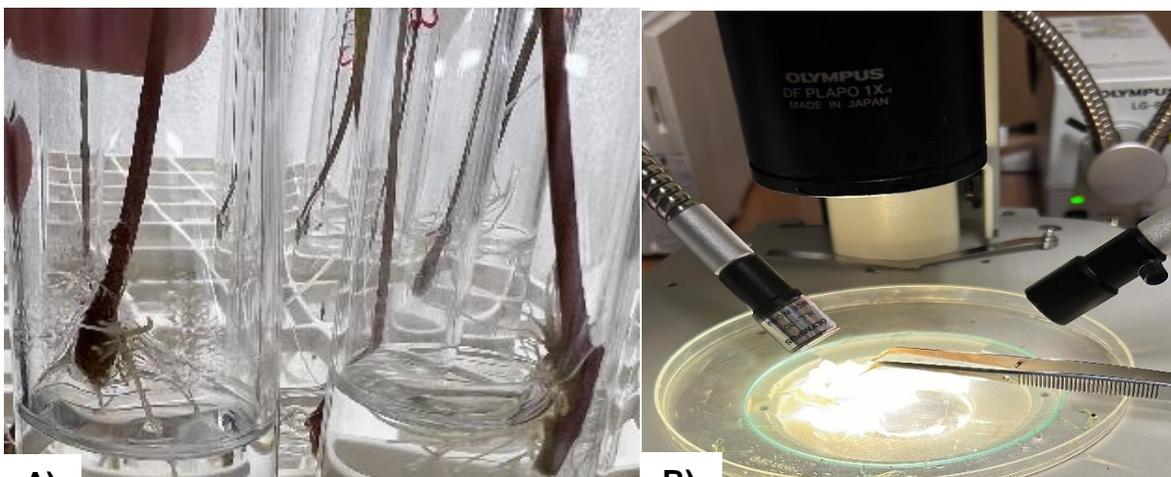
- Singh, A., Baranwal, V., Shankar, A., Kanwar, P., Ranjan, R., Yadav, S., Pandey, A., Kapoor, S., & Pandey, G. K. (2012). Rice phospholipase A superfamily: Organization, phylogenetic and expression analysis during abiotic stresses and development. *PLoS ONE*, *7*(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030947>
- Song, P., Jia, Q., Chen, L., Jin, X., Xiao, X., Li, L., Chen, H., Qu, Y., Su, Y., Zhang, W., & Zhang, Q. (2020). Involvement of arabidopsis phospholipase D δ in regulation of ROS-mediated microtubule organization and stomatal movement upon heat shock. *Journal of Experimental Botany*, *71*(20), 6555–6570.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA359>
- Takáč, T., Novák, D., & Šamaj, J. (2019). Recent advances in the cellular and developmental biology of phospholipases in plants. *Frontiers in Plant Science*, *10*(April). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00362>
- Van Der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, *11*(3), 296–310.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- Vessey, J. K. (1994). Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil*, *158*(2), 151–162.
<https://doi.org/10.1007/BF00009490>
- Wang, X. (2001). Lant hospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *52*, 211–231.
- Wang, Xuemin. (2005). Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiology*, *139*(2), 566–573. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068809>
- Wei, K., & Zhong, X. (2014). Non-specific lipid transfer proteins in maize. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0281-8>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R.,

- Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Yamaguchi, T., Minami, E., Ueki, J., & Shibuya, N. (2005). Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology*, 46(4), 579–587. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci065>
- Yan, Q., Wang, L., & Li, X. (2018). GmBEHL1, a BES1/BZR1 family protein, negatively regulates soybean nodulation. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25910-x>
- Yao, H. Y., & Xue, H. W. (2018). Phosphatidic acid plays key roles regulating plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(9), 851–863. <https://doi.org/10.1111/jipb.12655>
- Yu, Y., Chakravorty, D., & Assmann, S. M. (2018). The G protein β -subunit, AGB1, interacts with FERONIA in RALF1-regulated stomatal movement. *Plant Physiology*, 176(3), 2426–2440. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01277>
- Zaidi, A., Khan, M. S., & Musarrat, J. (2017). Microbes for legume improvement, second edition. *Microbes for Legume Improvement, Second Edition*, 1–412. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2>
- Zhang, G., Ahmad, M. Z., Chen, B., Manan, S., Zhang, Y., Jin, H., Wang, X., & Zhao, J. (2020). Lipidomic and transcriptomic profiling of developing nodules reveals the essential roles of active glycolysis and fatty acid and membrane lipid biosynthesis in soybean nodulation. *Plant Journal*, 103(4), 1351–1371. <https://doi.org/10.1111/tpj.14805>
- Zhang, G., Yang, J., Chen, X., Zhao, D., Zhou, X., Zhang, Y., Wang, X., & Zhao, J. (2021). Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated phospholipid metabolism and signaling modulate symbiotic interaction and nodulation in soybean (*Glycine max*). *Plant Journal*, 106(1), 142–158. <https://doi.org/10.1111/tpj.15152>

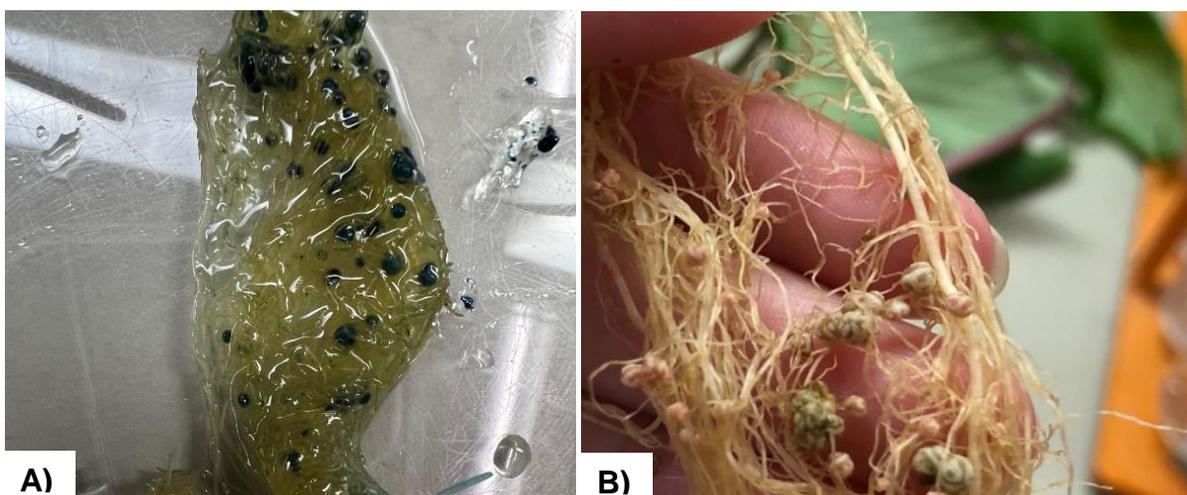
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., & Wang, X. (2004). Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9508–9513.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0402112101>
- Zhao, Jian. (2015). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: From protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signalling. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1721–1736.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru540>
- Zhao, Jian, Devaiah, S. P., Wang, C., Li, M., Welti, R., & Wang, X. (2013). Arabidopsis phospholipase D β 1 modulates defense responses to bacterial and fungal pathogens. *New Phytologist*, 199(1), 228–240.
<https://doi.org/10.1111/nph.12256>
- Zhao, Jiangzhe, Zhou, D., Zhang, Q., & Zhang, W. (2012). Genomic analysis of phospholipase D family and characterization of GmPLD α s in soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Research*, 125(4), 569–578.
<https://doi.org/10.1007/s10265-011-0468-0>

12. Anexos

Anexo 1. Generación de raíces transgénicas. A) Plantas de *P. vulgaris* con raíces transgénicas en crecimiento 10 dpi infectadas con C1 en medio B & D. B) Eliminación de raíces no portadoras del vector *PvFLD α 2:RNAi* o pTDT-DC-SAC (no fluorescentes) por medio del microscopio de epifluorescencia (Olympus SZX7).



Anexo 2. Análisis del fenotipo de nódulos en raíces transgénicas. A) Raíz de *P. vulgaris* con tinción GUS a 14 dpi en porta objetos para su posterior conteo de nódulos. B) Nódulos maduros a 21 dpi en raíces de *P. vulgaris*.



Anexo 3. Peso seco de nódulos y raíces en la medición de la nitrogenasa. A) Raíces secas de *P. vulgaris* en aluminio pesadas por balanza electrónica de precisión. B) Nódulos secos en tubo Eppendorf pesados por balanza electrónica de precisión.



