



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**Estudio de la participación de la fosfatidilinositol 3-cinasa durante
la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium
tropicum***

Tesista

MB. Georgina Estrada-Navarrete

***Director:* Dr. Federico Sánchez Rodríguez †
Instituto de Biotecnología UNAM**

***Codirector:* Dr. Aníbal R. Lodeiro
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular. UNLP-CONICET
Año 2017**

El presente Trabajo de Tesis
para optar al grado de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas
ha sido realizado en el
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas
UNLP-CCT-La Plata-CONICET y en el
Instituto de Biotecnología, UNAM
Bajo la dirección del
Dr. Federico Sánchez Rodríguez y la
Codirección del Profesor Dr. Aníbal R. Lodeiro

*“La simbiosis, el sistema en el cual miembros de especies diferentes
viven en contacto físico, es un concepto arcano,
un término biológico especializado que nos sorprende.
Esto se debe a lo poco conscientes que somos de su abundancia.
No son sólo nuestras pestañas e intestinos
los que están abarrotados de simbiosis animales y bacterianos;
si uno mira en su jardín o en el parque del vecindario
los simbiosis quizá no sean obvios pero están omnipresentes” [...]*

Lynn Margulis

Dedicatoria

A Mo, a Gezna y a Gitza con todo mi amor

A mis queridos padres Delia y Manuel-Epifanio

A mis queridos hermanos Ale, Marga, Juan[†], Flor, Jelus y José

A mis pequeños Emiliano, Eiktan y Aleix

A mis amigas Myriam, Xóchitl, Sonia y María Luisa

A mis amigos Julieta y Fer

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por la educación pública y gratuita que me permitieron mi formación de postgrado.

In memoriam de Federico, por apoyarme para continuar trabajar-estudiando y compartir sus ideas y entusiasmo por el trabajo científico. Porque contra viento y marea logró consolidar su grupo de trabajo académico, solidario y armonioso, “*Los Sanchez*”.

Especialmente a Aníbal, por su excelente trabajo como Codirector de Tesis, por su apoyo y asesoramiento crítico durante el desarrollo de la Tesis doctoral.

Mi Agradecimiento

A la Dra. Carmen Quinto, Dr. Luis Cárdenas, MB. Neftaly Cruz, Q.F.B. Xóchitl Alvarado, Dr. Aarón Barraza, Dra. Alejandra Hernández, Dra. Rosana Sánchez, MB. Juan E. Olivares, Dr. Manoj-Kumar y Dr. Ramiro Lascano, por su apoyo para concluir la publicación de este trabajo.

Al Q. Guillermo Krotzsch por el trabajo realizado en las figuras, sus sugerencias y comentarios al manuscrito.

A los académicos del Instituto de Biotecnología,

A la QFB. Xóchitl Alvarado-Affantranger mi amiga y colaboradora de toda la vida por su compromiso, habilidad y *expertise* en el trabajo de Microscopía de tejidos vegetales.

Al MB. Neftaly Cruz alumno, compañero y colaborador por el trabajo realizado en uno de nuestros temas favoritos, la autofagia.

A la Biol. Olivia Santana por su excelente trabajo en el mantenimiento del cepario del laboratorio.

Al MB. Juan Elías Olivares el mejor en el manejo de anticuerpos y proteínas.

A la Dra. Claudia Díaz por su visión para definir y concretar experimentos.

A la Biol. Noreide Nava por su apoyo y disposición técnico experimental.

A la Dra. Guadalupe Zavala por el análisis de los nódulos transgénicos de *P. vulgaris*.

A la MB. Alejandra Zayas, Dr. Rodolfo López, Dr. César de Los Santos, Dr. Pallavolu M. Reddy, MB. Jonathan Rodríguez, Dr. Pablo Peláez, Dr. Chandrasekar Balu, Biol. Isabel Flores, Dr. Marco A. Juárez, MB. Claudia Dorantes, Dr. Luis Servín, Dr. Guillermo Dávila y MB. Patricia Bustos.

A Leodegarda Benitez por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al Dr. Ramiro Lascano y al Dr. German Robert por los avances en el trabajo realizado durante la estancia en nuestro laboratorio.

A los académicos del IBBM, especialmente a la Dra. Julieta Pérez Giménez por largas discusiones del proyecto y el apoyo que me brindó durante mis estancias en La Plata.

A todos los integrantes del lab-R3, Dra. Florcita López, Dr. Ignacio Quelas, Dra. Julieta Covelli, Dra. Julia Althabegoiti y Dra. Piti López.

A la Dra. Andrea Peralta, Dr. Mario Aguilar, Dr. Antonio Lagares y Dr. Gonzalo Torres.

A la Dra. Andrea Murillo, por su apoyo, sugerencias y corrección de estilo del manuscrito.

A los miembros del jurado

Jose M. Estevez, Ph.D.

Fundación Instituto Leloir. Buenos Aires, Argentina.

Dr Fernando Pieckenstain

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM).

Dra. Silvana Petruccelli

Universidad de La Plata, Argentina.

A mis maestros, estudiantes, técnicos, postdoctorales y laboratoristas que de alguna manera contribuyeron al trabajo de PI3K. A todos, muchas gracias.

RESUMEN

La nodulación es un modelo muy interesante de la diferenciación celular y del desarrollo en plantas así como también de la interacción de las leguminosas con microorganismos simbiotes. En nuestro grupo estudiamos los mecanismos de señalización durante la organogénesis de los nódulos en las raíces de *Phaseolus vulgaris* L. (poroto común, también conocido como frijol). El poroto es de gran importancia económica y una fuente de proteínas para la nutrición de más de 500 millones de personas en los países en desarrollo (Graham y Vance, 2003). Las leguminosas establecen asociaciones simbióticas con bacterias gram-negativas (rizobios) y con hongos arbusculares (HA) que facilitan la adquisición de nutrientes tales como el nitrógeno y el fósforo.

La simbiosis entre las leguminosas y los rizobios da lugar a la formación de nódulos en la raíz y a la fijación simbiótica de nitrógeno (Denarie y Cullimore, 1993). La interacción del microsimbionte se inicia con un diálogo molecular que involucra flavonoides liberados por la raíz, los cuales inducen en la bacteria la síntesis de un lipo-quitooligosacárido conocido como Factor Nod (FN), el cual es a su vez es liberado por la bacteria hacia la raíz. El FN actúa como un regulador de crecimiento de la planta, disparando los procesos de diferenciación que culminan con la formación de las estructuras simbióticas, llamadas nódulos. Dentro de los nódulos las bacterias simbióticas se diferencian y se engloban en simbiosomas, los cuales son estructuras especializadas intracelulares desarrolladas *de novo* dentro de nódulos de las raíces (Oldroyd y Downie, 2008).

La fase de entrada del huésped a la raíz es crucial para el establecimiento de las bacterias, ésta ocurre a través de los pelos radicales que se curvan en la punta y es seguida de la formación de un hilo de infección, el cual se alarga desde la región apical para avanzar hacia las células corticales donde se ramifica. Después de reiniciada la división celular de la planta, se forma el primordio del nódulo. Cuando los hilos de infección alcanzan las células del primordio del nódulo, se liberan las bacterias y se diferencian en bacteroides, al tiempo que el nódulo madura para dar lugar a un nódulo funcional fijador de nitrógeno (Oldroyd *et al.*, 2011). La formación de los nódulos y el establecimiento de los simbiotes requieren la reorganización del citoplasma de la célula que determina el avance y la dirección exitosa.

La ruta de señalización de la simbiosis desde la inducción por los FN hasta la formación del nódulo es muy conservada y se conoce como ruta simbiótica común. La red de señalización que subyace en estas interacciones mutualistas también ha sido muy estudiada y se sabe que implica cambios de oscilaciones iónicas y del citoesqueleto (Cárdenas *et al.*, 2000; Oldroyd, 2013).

Los fosfoinosítidos son moléculas que forman parte de las membranas plasmáticas y también han sido implicados en la señalización mediada por FN. Sin embargo, se sabe

poco sobre su papel en la modulación de la interacción simbiótica (Pingret *et al.*, 1998; Engstrom *et al.*, 2002; Charron *et al.*, 2004; Peleg-Grossman *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2009).

Entre los fosfoinosítidos, el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) es muy importante, su etapa final de biosíntesis es catalizada por la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En *Arabidopsis thaliana* la PI3K está codificada por el gen único para la proteína de clasificación vacuolar (VPS34). En las plantas y en *Saccharomyces* solo se encuentra esta cinasa, la cual pertenece a la clase III y no se han reportado cinasas de las clases I y II de la familia PI3K.

Algunos reportes apuntan a la importancia de la PI3K en el desarrollo y crecimiento de la planta (Welters *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2008b) y la elevada expresión del gen en tejidos simbióticos sugiere que participa durante la simbiosis de plantas leguminosas (Hong y Verma, 1994; Hernández *et al.*, 2004; Peleg-Grossman *et al.*, 2007). También se ha reportado que la PI3K tiene un papel crucial en disparar la autofagia cuando hay limitación de nutrientes y durante la defensa, lo que se conoce como respuesta hipersensible, la cual es un tipo de muerte celular programada para constreñir la infección por patógenos (Liu *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que PI3K/VPS34 tiene un papel esencial en la autofagia (Klionsky y Ohsumi, 1999; Levine y Klionsky, 2004) y cuando PI3K/VPS34 interactúa con otras proteínas tales como VPS30/BECLIN 1 y VPS15, forma un complejo multiproteico que define esta función (Kametaka *et al.*, 1998). En *A. thaliana* recientemente se encontró una nueva proteína, la SH3P2 (proteína 2 con dominio SH3), que se une a PI3P río abajo de este complejo y ha sido implicada en la biogénesis del autofagosoma. El autofagosoma es una estructura de doble membrana o multi-membrana que envuelve el material citosólico que está destinado para su entrega a la vacuola (Zhuang *et al.*, 2013). La macroautofagia (aquí llamada autofagia) es un proceso celular catabólico que implica la entrega de componentes citosólicos (incluyendo orgánulos enteros, macromoléculas y patógenos invasores) a la vacuola para su degradación y reciclaje (Klionsky y Ohsumi, 1999). La autofagia está involucrada en casi todos los aspectos de la vida de la planta, particularmente con los relacionados con el déficit y reciclado de nutrientes (Michaeli *et al.*, 2016).

Con estos hallazgos que involucran a la PI3K y PI3P en autofagia, enfocamos nuestra atención en determinar su función en la infección de las raíces de poroto por *Rhizobium tropici* durante la formación del hilo de infección y de las células infectadas de los nódulos.

Con el propósito de conocer el mecanismo de señalización de PI3K de *Phaseolus vulgaris* en el proceso de la simbiosis, se analizó su expresión (PvPI3K) en raíces silvestres de *P. vulgaris* inoculadas con *Rhizobium* en dos diferentes etapas; las tempranas de 6 a 144 h y las tardías de 10 a 30 días post-inoculación. Se encontró un incremento significativo de la

expresión de PI3K mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR) en etapas tempranas (a las 96 horas) en raíces inoculadas, comparadas con las no-inoculadas. Su expresión también se incrementó en etapas tardías, lo cual se observó en una cinética de nodulación alrededor de los 20 días después de la inoculación con la bacteria.

Nuestro grupo reportó previamente una técnica novedosa para inducir raíces transgénicas en plantas compuestas de poroto con *Agrobacterium rhizogenes*, de tal forma que las raíces transformadas son susceptibles de formar nódulos transgénicos al inocularlas con *Rhizobium* (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006). En este trabajo se utilizó esta técnica y se planteó la estrategia del análisis por genómica funcional. Se utilizó una construcción con el promotor del gen de PvPI3K fusionado al gen de la β -glucuronidasa (GUS) (Cruz, 2011) para obtener raíces transgénicas y estudiar la respuesta de la expresión de PvPI3K a la inoculación con rizobios. Se determinó la actividad de GUS, lo que nos permitió analizar su expresión diferencial en los tejidos de raíces inoculadas comparadas con las no inoculadas.

Para conocer la función de la PvPI3K durante la interacción de *P. vulgaris* con *Rhizobium*, se diseñó una construcción molecular con un RNA de interferencia (RNAi) específico dirigido al gen de PvPI3K que lleva a la pérdida de la función. Se transformó *Agrobacterium rhizogenes* K599 con la construcción para obtener raíces transgénicas de poroto que nos permitieron analizar el fenotipo simbiótico. Usando esta estrategia se tuvieron los avances que se describen a continuación.

En plantas con pérdida de la función de PvPI3K se observó un fenotipo en el desarrollo de la parte aérea de las plantas. Se encontró que el tamaño de las hojas de las plantas con el PvPI3K-RNAi fue menor respecto al de las plantas control. Además en estas plantas se observó un incremento en la eficiencia fotosintética.

Se analizó con detalle el fenotipo de las raíces transgénicas durante los eventos de la simbiosis por medio de microscopía confocal. Se observaron eventos tempranos de infección en las raíces con PvPI3K-RNAi inoculadas con *Rhizobium*-GFP, incluyendo el enrulado y la formación de los hilos de infección. De manera paralela se cuantificaron los pelos radicales, que son la vía de entrada del simbionte. Se encontró una disminución en los pelos radicales en crecimiento, en la respuesta del enrulado al rizobio y en el avance de los hilos de infección en las raíces que poseían el PvPI3K-RNAi comparadas con las raíces control.

Las plantas que contenían el PvPI3K-RNAi se utilizaron para evaluar la nodulación de la raíz. En raíces inoculadas con *R. tropici* se determinó el nivel de transcrito por RT-qPCR. Después de 21 días post-inoculación, se encontró una disminución en el número de nódulos en las raíces con bajos niveles de transcrito (alrededor de 60%).

En levadura se han identificado los genes que codifican para las proteínas VPS34/PI3K, BECLINA1/ATG6, VPS15 y ATG14 como integrantes del complejo I implicado en autofagia (Kihara *et al.*, 2001a). En plantas, sin embargo, los componentes del complejo de PI3K no han sido del todo caracterizados. Por ejemplo el gen *Atg14* (por sus siglas, *Autophagic related gene*) no se ha encontrado en *Arabidopsis* y tampoco la encontramos en la base de datos disponible del genoma de poroto Phytozome v11 (<http://www.phytozome.net>). Con el propósito de determinar los niveles de transcrito de los genes involucrados en la formación del complejo PI3K de autofagia y el gen *Atg8*, uno de los genes considerado universal para monitorear el proceso de autofagia (Xie *et al.*, 2008), se cuantificó por RT-qPCR el nivel de transcrito de los genes involucrados en autofagia (*Beclina1*, *Vps15* y *Atg8*) en raíces con pérdida de la función de PI3K (66% de nivel de transcrito disminuido), encontrándose que todos disminuyeron en diferentes proporciones.

Ya que PI3K, BECLINA1 y PI3P (producto de la actividad PI3K) son componentes importantes en autofagia para la formación del autofagosoma, se decidió usar otra construcción con *Beclina1*-RNAi para analizar la pérdida de la función de *Beclina1* (Cruz, 2014), así como la expresión de un biosensor, el dominio FYVE que se une específicamente al PI3P (Gaulhier *et al.*, 1998). Este dominio se ha utilizado previamente para localizar PI3P en otras plantas como caupí (protoplastos), tabaco (células BY-2) y *Arabidopsis* (células epidermales y otros tipos de células) (Vermeer *et al.*, 2006).

Encontramos que la expresión del dominio FYVE muestra un fenotipo similar al de *PvPI3K*-RNAi. En cuanto a la inhibición de los hilos de infección y la pérdida de función del gen que codifica para *Beclina1* (*Beclina1*-RNAi), se observó un fenotipo deteriorado en simbiosis, similar al observado en las raíces transgénicas con *PvPI3K*-RNAi. En ambos casos se afectó la simbiosis, disminuyendo drásticamente la nodulación de *P. vulgaris* con *R. tropici*, confirmando que la autofagia es un proceso crucial para esta interacción simbiótica.

La pérdida de la función de *PvPI3K* también se analizó en la interacción de *P. vulgaris* con el hongo arbuscular (HA) *Rhizophagus irregularis* y se observó que la misma afectó negativamente la simbiosis. La típica colonización por los hongos arbusculares (HA) que se observó en las raíces control (hifas extra e intraradicales, el hipopodium y los arbusculos) no se encontró en las raíces transgénicas con el *PvPI3K*-RNAi después de tres semanas de inoculación. En raíces con pérdida de la función de *PvPI3K*, se encontró un incremento de hifa extraradical (formando los denominados “dedos hinchados”) y una disminución significativa tanto en el porcentaje de colonización de la raíz como en la activación de la transcripción del transportador de fosfato *Pv-PT4*, un marcador molecular de colonización del hongo arbuscular (Javot *et al.*, 2007). Este resultado adicional confirma, por primera vez, el papel de *PvPI3K* relacionado con la autofagia en dos importantes asociaciones mutualistas (Estrada-Navarrete *et al.*, 2016).

Finalmente, en la Tesis se discute la expresión de PvPI3K durante la simbiosis, su importancia durante el desarrollo de la planta, así como los resultados de la pérdida de la función de PI3K en las respuestas tempranas y en la nodulación. Nuestros resultados sugieren que la autofagia proporciona precursores para el crecimiento del pelo radical y del hilo de infección. Por ser un proceso muy conservado en eucariontes, se discute acerca de la participación de PI3K a través de la formación del complejo que determina su función en autofagia comparado con el que se conoce en levadura. También se discute el mecanismo de regulación del modelo de células animales, recientemente reportado por [Mi et al. \(2015\)](#), en el sentido de la participación de componentes cruciales para iniciar la autofagia que son: la polimerización de actina en filamentos cortos, la proteína relacionada con autofagia ATG8 y los niveles de PI3P. En conjunto, estos datos indican que la autofagia tiene una función clave en las interacciones mutualistas entre la planta y los microorganismos simbióticos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	7
ÍNDICE GENERAL	13
ÍNDICE DE FIGURAS	18
ÍNDICE DE TABLAS	21
LISTA DE ABREVIATURAS	22
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	
I.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> (L.), su origen y características generales	25
I.2 La importancia del estudio de <i>P. vulgaris</i>	26
I.3 <i>Phaseolus vulgaris</i> como leguminosa modelo	28
I.4 La fijación biológica del nitrógeno y la simbiosis	29
I.4.1 La capacidad simbiótica de las leguminosas	30
I.5 La simbiosis rizobio-leguminosa y la formación del nódulo	30
I.5.1 El reconocimiento y el dialogo molecular simbiótico	31
I.5.2 Respuesta inicial de la simbiosis, el enrollado del pelo radical	33
I.5.3 La infección bacteriana y la organogénesis del nódulo	34
I.5.4 La formación del hilo de infección en el pelo radical	34
I.5.5 La formación del nódulo	36
I.6 El establecimiento de la simbiosis	38
I.7 Factores involucrados en la señalización simbiótica	39
I.8 Los fosfoinosítidos de plantas	41
I.9 El dominio FYVE se une específicamente al fosfatidilinositol 3-fosfato	42
I.10 La familia de las fosfatidilinositol 3-cinasas y su clasificación	44
I.11 Fosfatidilinositol 3-cinasa clase III	47
I.12 PI3K clase III participa en la formación de autofagosomas en plantas	48
I.13 Posible relación con el proceso simbiótico	52
I.14 Métodos de estudio de la función de PI3K	53
I.15 Hipótesis	54
I.16 Objetivos	54
I.16.1 General	54
I.16.2 Específicos	55

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1	Cepas utilizadas en este trabajo	57
II.2	Plásmidos utilizados	58
II.3	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	59
II.4	Soluciones	60
II.5	Oligonucleótidos usados en éste trabajo	62
II.6	Biología Molecular	63
	II.6.1 Purificación de plásmido	63
	II.6.2 Purificación de DNA genómico	63
	II.6.3 Extracción de RNA	63
	II.6.4 Electroforesis de DNA	64
	II.6.5 RT-PCR <i>in situ</i>	64
	II.6.6 RT-PCR semicuantitativo	65
	II.6.7 Cuantificación de los niveles de transcrito por análisis de transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR en tiempo real)	66
	II.6.7.1 Síntesis de cDNA	66
	II.6.7.2 Reacción de qPCR	66
	II.6.8 PCR de colonia	67
II.7	Estudios Bioinformáticos	67
	II.7.1 Análisis filogenético	67
	II.7.2 Números de acceso del Banco de genes	68
	II.7.3 Obtención del clon de PI3K de <i>Phaseolus vulgaris</i>	69
II.8	Construcción de vectores	69
	II.8.1 Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	69
	II.8.2 Clonación de productos de PCR en el vector pENTR/D-TOPO	69
	II.8.3 Transformación de células electro-competentes de <i>E. coli</i>	70
	II.8.4 Reacción de recombinación con el vector binario	70
	II.8.5 Preparación de células electro-competentes de <i>A. rhizogenes</i>	72
II.9	Generación de plantas compuestas de <i>P. vulgaris</i>	72
	II.9.1 Desinfección y germinación de semillas	72
	II.9.2 Preparación del inóculo e infección de las plántulas	73
	II.9.3 Obtención de raíces peludas de <i>P. vulgaris</i>	74
II.10	Cuantificación de pelos radicales	74
	II.10.1 Aislamiento de pelos radicales y puntas de raíz	74
II.11	Ensayo de nodulación de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	75
II.12	Análisis de la actividad fotosintética de las plantas compuestas de <i>P. vulgaris</i>	75
II.13	Inoculación con esporas de <i>Rhizophagus irregularis</i> y micorrización	76
II.14	Tinción de Micorrizas	76

II.15	Cuantificación de la colonización micorrícica	77
II.16	Ensayo de reducción de acetileno	77
II.17	Análisis microscópico y de imágenes	78
II.18	Microscopía óptica de nódulos embebidos en resina <i>LR-White</i>	78
II.19	Análisis estadístico	79

CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA DEL GEN PI3K Y CONSTRUCCIONES

III.1	Aislamiento del clon de cDNA de PI3K	81
III.2	Aislamiento del clon genómico de PI3K	83
III.3	Caracterización de PI3K en <i>Phaseolus vulgaris</i>	84
III.4	El gen de <i>PI3K</i> de clase III de <i>P. vulgaris</i> , codifica para una cinasa conservada	86
	III.4.1 Estudios bioinformáticos	86
III.5	Construcción de RNAi para el mensajero de <i>PvPI3K</i>	88
III.6	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> disminuye la autofagia	91

CAPITULO IV. EFECTOS DE PI3K EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA, LA FOTOSÍNTESIS Y LA INTERACCIÓN TEMPRANA CON RIZOBIOS

IV.1	Niveles de transcrito de PI3K en las raíces silvestres de <i>Phaseolus vulgaris</i>	96
IV.2	Niveles de transcrito y su localización durante la simbiosis entre <i>P. vulgaris</i> y <i>R. tropici</i>	98
IV.3	Localización de transcritos de <i>PvPI3K in situ</i> en nódulos de <i>P. vulgaris</i>	100
IV.4	<i>PvPI3K</i> se expresa en pelos radicales de <i>P. vulgaris</i>	102
IV.5	La actividad del promotor <i>proPvPI3K:GFP-GUS</i> durante la simbiosis nodular de <i>P. vulgaris</i>	103
IV.6	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> afecta el crecimiento de pelos radicales	104
IV.7	<i>PvPI3K</i> está involucrada en el desarrollo de plantas compuestas de poroto	108
IV.8	<i>PvPI3K-RNAi</i> afecta el funcionamiento de las hojas de plantas compuestas	109
IV.9	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> contrarresta las respuestas tempranas de infección con <i>R. tropici</i>	112

CAPITULO V. EFECTOS DE PI3K EN LA INFECCIÓN, NODULACIÓN Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO

V.1	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> deteriora la nodulación en las plantas compuestas de poroto	116
V.2	<i>PvPI3K-RNAi</i> contrarresta la infección de nódulos de <i>P. vulgaris</i>	116
V.3	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> daña la fijación de nitrógeno de plantas compuestas de poroto	119
V.4	La expresión del dominio FYVE imita el daño producido en la nodulación en raíces con pérdida de la función de PI3K	120

CAPÍTULO VI. EFECTOS DE PI3K SOBRE LAS MICORRIZAS DE *P. VULGARIS*

VI.1	La simbiosis de hongos arbusculares (HA) en plantas	124
VI.2	Los niveles de transcrito y la actividad del promotor de <i>PvPI3K</i> en las raíces de <i>P. vulgaris</i> después de la inoculación con el hongo <i>R. irregularis</i>	126
VI.3	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> daña la simbiosis de micorrizas arbusculares	128
VI.4	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> impide la colonización de hongos arbusculares y la expresión del transportador de fosfato <i>PvPT-4</i>	130

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

VII. 1	PI3K participa en dos procesos importantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> , la simbiosis y el desarrollo celular	133
VII.2	La pérdida de la función de PI3K inhibe la infección de <i>P. vulgaris</i> con <i>R. tropici</i> y con <i>R. irregularis</i> durante los eventos tempranos de la simbiosis	134
VII.3	PI3K es esencial para el crecimiento apical de los pelos radicales y del hilo de infección de <i>R. tropici</i>	135
VII.4	La sobreexpresión del dominio FYVE fenocopia la pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> durante la nodulación de poroto	136
VII.5	El complejo PI3K que inicia el proceso de autofagia es esencial para la relación simbiótica de <i>P. vulgaris</i> con <i>Rhizobium</i> y con el hongo arbuscular	136
VII.6	Avances y perspectivas	139

CAPITULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
--	-----

APÉNDICE	160
-----------------	-----

Anexo 1. Alineamiento usado para generar el árbol filogenético de la Figura 16	
--	--

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	La importancia del estudio de <i>Phaseolus vulgaris</i>	26
Figura 2	Esquema del proceso del reconocimiento entre la leguminosa y los rizobios	32
Figura 3	Etapas tempranas de la infección por rizobacterias, el enrollado del pelo radical y la formación del hilo de infección	34
Figura 4	Modelo de crecimiento del hilo de infección del rizobio en los pelos radicales	36
Figura 5	Eventos de las etapas de desarrollo de nódulos de tipo determinado	37
Figura 6	Componentes de la ruta simbiótica común en la señalización de los eventos que ocurren durante la interacción mutualista entre leguminosas con <i>Rhizobium</i> y con hongos de micorrizas arbusculares	40
Figura 7	La molécula de PI	41
Figura 8	Clasificación de la familia PI3K	44
Figura 9	Actividad de las PI3Ks <i>in vitro</i>	45
Figura 10	Formación de vesículas autofágicas	49
Figura 11	Participación del Complejo PI3K en la formación de autofagosomas en <i>Arabidopsis</i>	51
Figura 12	Esquema del procedimiento de generación de plantas compuestas de poroto	73
Figura 13	Aislamiento y obtención del clon de cDNA de PvPI3K	82
Figura 14	Secuenciación del clon genómico de PI3K	84
Figura 15	Secuencia de nucleótidos del clon de cDNA de PI3K de <i>P. vulgaris</i> y la secuencia de aminoácidos deducida	85
Figura 16	Organización del gen, la proteína y el análisis filogenético de PI3Ks clase III	87
Figura 17	Diagrama de obtención del clon pTDT-PvPI3K-RNAi	89

Figura 18	Construcción del RNA de interferencia para el mensajero de <i>PvPI3K</i>	91
Figura 19	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> disminuye los niveles de transcrito de genes de autofagia	93
Figura 20	La pérdida de la función de <i>Beclina1</i> disminuye la nodulación	94
Figura 21	Niveles de expresión del gen <i>PvPI3K</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> silvestre inoculado con <i>R. tropici</i> CIAT899	96
Figura 22	Perfil de expresión de <i>PvPI3K</i> de acuerdo al Atlas de Expresión Génica de <i>Phaseolus vulgaris</i> ; <i>PvGEA</i> (cv. Negro Jamapa)	97
Figura 23	Niveles de transcrito de <i>PvPI3K</i> en las raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i> tipo salvaje	99
Figura 24	Localización de transcritos <i>PvPI3K</i> en nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	101
Figura 25	Actividad del promotor <i>proPvPI3K:GFP-GUS</i> en las raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i>	102
Figura 26	La actividad del promotor <i>proPvPI3K:GFP-GUS</i> durante la simbiosis	104
Figura 27	Niveles de transcrito de raíces silenciadas en <i>PvPI3K</i>	105
Figura 28	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> afecta el crecimiento de pelos radicales y el desarrollo de las plantas compuestas	107
Figura 29	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> afecta el desarrollo de las plantas compuestas	109
Figura 30	La pérdida de la función de <i>PI3K</i> incrementa el funcionamiento de las hojas	111
Figura 31	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> contrarresta la respuesta temprana de infección con <i>R. tropici</i>	113
Figura 32	Fenotipo de nodulación en las raíces de poroto con la pérdida de la función de <i>PvPI3K</i>	116

Figura 33	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> contrarresta el desarrollo del nódulo de la raíz	118
Figura 34	Actividad de la nitrogenasa en nódulos transgénicos de <i>P. vulgaris</i>	119
Figura 35	La expresión del dominio FYVE imita el daño en la nodulación producido en raíces con pérdida de la función de PI3K	121
Figura 36	Fenotipo del hilo de infección del pelo radical de <i>P. vulgaris</i> expresando el dominio FYVE	122
Figura 37	Esquema de la simbiosis de micorrizas arbusculares en plantas con flores	125
Figura 38	Niveles de transcrito de <i>PvPI3K</i> y actividad del promotor de <i>PvPI3K</i> en raíces de <i>P. vulgaris</i> después de la inoculación con <i>Rhizophagus irregularis</i>	127
Figura 39	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> perjudica la simbiosis de micorrizas arbusculares de <i>P. vulgaris</i>	129
Figura 40	La pérdida de la función de <i>PvPI3K</i> inhibe la colonización de micorrizas arbusculares y los niveles de transcrito del transportador de fosfato (<i>PvPT-4</i>)	130
Figura 41	Modelo propuesto de la participación de PI3K en las células epidérmicas de la raíz durante la formación de estructuras endosimbióticas	138

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cepas utilizadas en este trabajo	57
Tabla 2	Plásmidos utilizados	58
Tabla 3	Solución B&D	60
Tabla 4	Solución de aislamiento de DNA	61
Tabla 5	Solución D concentrada	61
Tabla 6	Oligonucleótidos usados en este trabajo	62
Tabla 7	Números de acceso de las secuencias de las proteínas PI3K clase III utilizadas para el alineamiento y el árbol filogenético	68

ABREVIATURAS

CaMV 35S	promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor
CCaMK	<i>calcium calmodulin dependent serine/treonine protein kinase</i> , también llamado <i>DMI3</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico copia
CT	ciclo umbral de detección de qPCR
<i>DMI1</i>	gen <i>does not make infections</i> , también llamado <i>POLLUX</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dpi	días post-inoculación
DS	Desviación estándar
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético
EF1 α	Factor de elongación 1 α
ENODs	<i>Early Nodulins</i>
EPS	Exopolisacáridos
ERN	<i>Ethylene Response Factor Required for Nodulation</i>
FMyc	Factores de Micorrización
FN	Factores de Nodulación
<i>FYVE</i> domain	Sigla formada de las primeras cuatro proteínas donde se encontró [<i>Fab1</i> ; <i>YOTB</i> (<i>yeast orthologue of PIKfyv</i>), <i>Vac1</i> (<i>vesicle transport protein</i>) y <i>EEA1</i> (<i>Early Endosome Antigen1</i>)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GTP	guanosina tri-fosfato
GUS	β -glucuronidasa
h	hora
ha	hectárea
HA	Hongo arbuscular
HD-Zip	<i>homeodomain-leucine zipper</i>
His	epitope de histidinas
hpi	horas post-inoculación
HR	<i>Hypersensible response</i>
Hrs	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
IPD3	<i>interacting protein of DMI3</i>
LCOs	Lipoquitoligosacaridos
LPS	Lipopolisacáridos
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
LY	LY294002
LYK3	<i>LysM domain receptor like kinase III</i>
LysM	<i>N-acetyl-glucosamine binding lysin motifs</i>
LysMRLK	receptores con dominios LysM

mg	miligramo
miRNA	microRNA
min	minutos
MOPS	ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico ácido 4-(N-Morfolino) propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
MVBs	<i>Multivesicular Bodies</i>
MP	marcador de peso molecular
<i>NFP</i>	<i>Nod Factor Perception</i>
<i>NFR1/5</i>	<i>Nod Factor Receptor 1 / 5</i>
<i>NSP2</i>	<i>Nodulation Signaling Pathway 2</i>
NUP	nucleoporina
OD ₆₀₀	Densidad Óptica de una muestra medida con una longitud de onda de 600 nm
pb	pares de bases
PBS-T	amortiguador de fosfato salino con Tween 20%
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PIP	Fosfatidilinositol fosfato
PT-4	<i>Transportador de fosfato-4</i>
RE	Retículo endoplasmático
RLK	<i>receptor like kinase</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RT-qPCR	<i>Real Time</i> , Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa
RT	transcripción reversa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SEM	error estándar de la media
S	segundos
<i>SYMRK</i>	<i>Symbiosis receptor-like kinase</i>
TBE	tris buffer EDTA
TBS	tris buffer salino
T-DNA	DNA de transferencia
TF	<i>Transcription Factor</i>
TGN	<i>Trans Golgi Network</i>
WM	Wormanina
xg	veces de gravedad
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1 *Phaseolus vulgaris* (L.), su origen y características generales

Phaseolus vulgaris (L.) también conocido como poroto, frijol, alubia, caraota o judía, es una planta que se originó en América y se domesticó en dos localidades geográficas que abarcan dos grandes zonas de dicho continente. Las distintas variedades existentes derivan de un ancestro común de más de 100.000 años de antigüedad, con dos grupos genéticamente bien diferenciados; uno en Mesoamérica (del Norte de México a Colombia) y otro en la región andina (Sur de Perú, Bolivia y Noroeste de Argentina). Estos grupos silvestres se domesticaron de manera independiente y paralela en ambas regiones hace aproximadamente 8.000 años (Bitocchi *et al.*, 2013). Los porotos secos de ambos grupos genéticos se llevaron a la Península Ibérica hace 500 años y se distribuyeron al resto de Europa, África y Asia tiempo después (Castro-Guerrero *et al.*, 2016) (Figura 1 A). *P. vulgaris* es la especie más conocida del género *Phaseolus*, el cual pertenece a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Faboideae*. La familia de las Fabáceas (*Fabaceae*) o Leguminosas (*Leguminosae*) está compuesta de tres subfamilias. Sin embargo, existe información y evidencias moleculares y morfológicas que sustentan que las leguminosas son un sola familia (Lewis *et al.*, 2005).

En el continente americano el género *Phaseolus* es el más diverso y con mayor distribución. En México se encuentran aproximadamente 65 especies de 150 de este género, las cuales se cultivan en amplias zonas de distintos ambientes ecológicos, desde casi el nivel del mar hasta los 3.000 m de altura. La mayoría de las especies de *Phaseolus* –49 de ellas– crecen desde ambientes templados a fríos, subhúmedos a semiáridos y diez de ellas son exclusivas de bosques de coníferas y encinos. México cuenta también con una amplia diversidad de variedades cultivadas o razas criollas cada una adaptada localmente, desplegando diferentes tipos de crecimiento, coloración de flor, fruto y semillas (Figura 1 B). Paradójicamente, la especie más estrechamente emparentada con *P. vulgaris*, *P. viridis*, solo crece en tres estados de la República Mexicana, en dos tipos de vegetación y sus poblaciones son escasas en número de individuos. Existen también varias especies silvestres, que de manera similar, habitan solo en pocos tipos de vegetación y en poblaciones reducidas; al parecer, han permanecido y resistido así por varios miles de años (Delgado-Salinas *et al.*, 2006).

I.2 La importancia del estudio de *P. vulgaris*

Entre las características generales por las cuales el estudio de *P. vulgaris* es considerado de especial interés se encuentran: primera, su valor nutricional, ya que es un constituyente fundamental en la dieta alimenticia humana desde los orígenes de la

civilización. Segunda, porque ha sido y es un producto con un gran valor comercial (**Figura 1 C**). Tercera, pertenece a la familia de plantas más numerosa después de las gramíneas, con unos 700 géneros y alrededor de 18.000 especies que van desde pequeñas hierbas hasta los grandes árboles, se caracterizan por tener vaina y se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial. Finalmente, por la relación simbiótica con los microorganismos del suelo (**Figura 1 D**).

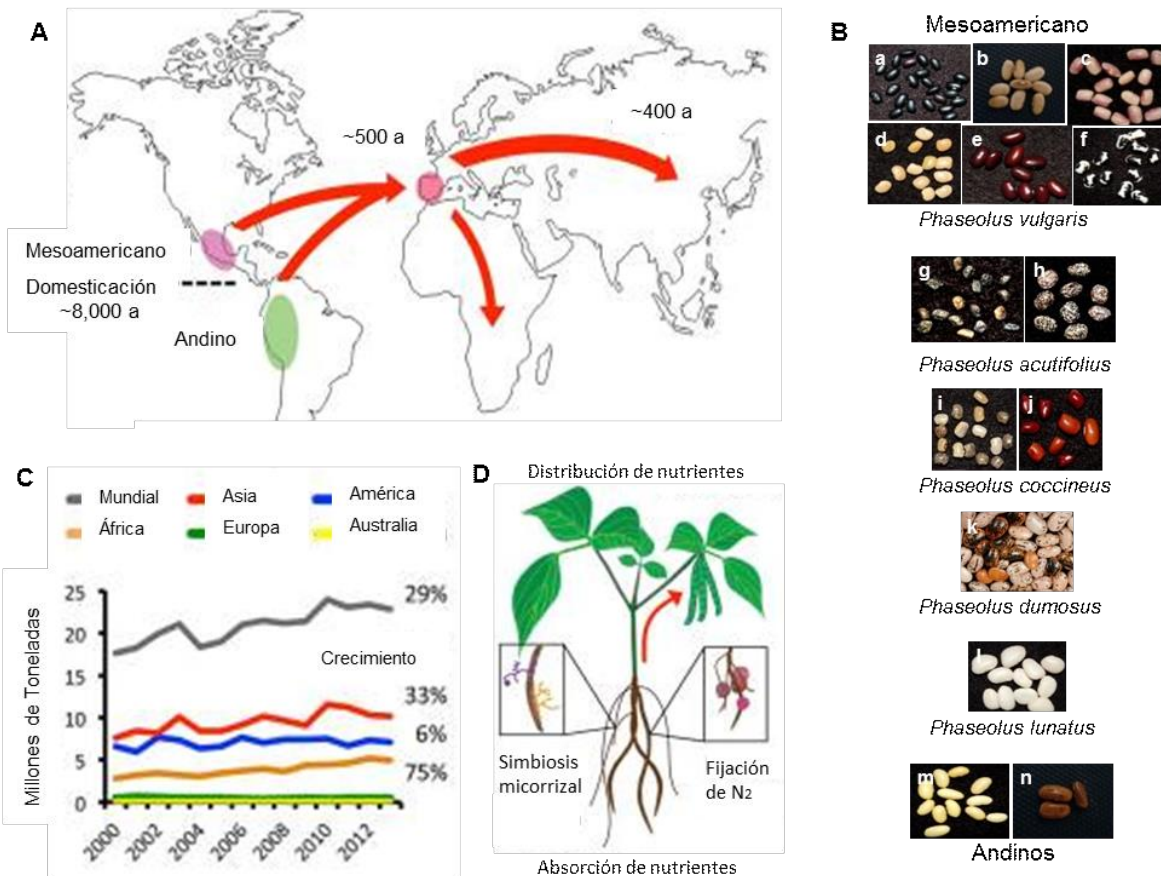


Figura 1. La importancia del estudio de *Phaseolus vulgaris*. (A) Distribución geográfica seguida de la domesticación en América. (B) Fotografías de algunas variedades de las cinco especies comestibles mesoamericanas y andinas. Cultivares: (a) Negro Jamapa; (b) BAT93; (c) Flor de mayo; (d) Morelos; (e) Dor364; (f) Vaquita; (g) Morelia; (h) Chiapas; (i) Morelos; (j) Oaxaca; (k) SINAREFI; (l) UNALM-1; (m) Peruano y (n) G19833. Se puede observar la diversidad de frijol en términos de forma tamaño y color. (C) La producción del poroto (millones toneladas) a nivel mundial en las últimas décadas muestra que África tiene un rápido crecimiento comparada con la producción en Asia y América (gráfica creada con datos disponibles en <http://faostat3.fao.org>). (D) La asociación de poroto con hongos arbusculares y bacterias fijadoras de N₂ facilita la absorción y asimilación de fósforo y nitrógeno (Figura modificada de Castro-Guerrero *et al.*, 2016).

Valor nutricional de *P. vulgaris*

El cultivo de *P. vulgaris* es el tercero más importante en el mundo por su alto contenido proteico (20-30%) después de la soja y el maní (Singh *et al.*, 1999).

La combinación cereal-leguminosa es una fuente de proteína de alto valor nutritivo. Las leguminosas son deficientes en metionina, pero contienen lisina, complementando a los cereales, los cuales son deficientes en lisina y ricos en metionina.

P. vulgaris es una fuente importante de proteínas y calorías, más de 200 millones de personas en el África subsahariana dependen de este cultivo como un alimento básico (Schmutz *et al.*, 2013). En los países en desarrollo también es una buena fuente de minerales ya que contiene más hierro (alrededor de 55 µg / g) y zinc (alrededor 35 µg / g) que los cereales (Beebe *et al.*, 2000). En México representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas. Los porotos de *P. vulgaris* son una fuente excelente de minerales con efectos benéficos para la salud por su alto contenido de tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico. Una ingesta regular de porotos de *P. vulgaris* favorece la disminución de los niveles de colesterol y reduce los riesgos de padecer cáncer (Anderson y Gustafson, 1989). En su cascarilla, específicamente en los porotos de tonalidades oscuras, existen antioxidantes de la familia de los flavonoides conocidos como antocianinas que tienen propiedades anticancerígenas, antitumorales y antiinflamatorias, entre otras (Galvez y Salinas, 2015). La fibra dietética de *P. vulgaris* contiene celulosa y hemicelulosa que previenen la constipación y mantienen el índice glicémico fisiológico normal. Además, posee componentes que se vinculan con una reducción en la síntesis de ácidos grasos en el organismo (Oohmah *et al.*, 2010).

Importancia en la economía mundial

En América Latina se produce casi la mitad de la producción mundial de porotos de *P. vulgaris*, siendo Brasil y México los principales países productores. A nivel mundial los principales productores son Brasil, India, China, Myanmar o Birmania (Asia), México y Estados Unidos de América ([http:// apps.fao.org/faostat](http://apps.fao.org/faostat)). El consumo per cápita, la extensión territorial requerida para su cultivo y el costo de producción, convierten a este cultivo en una valiosa fuente económica para los distribuidores.

Dos de los principales países productores, India y Brasil son los mayores consumidores y juntos concentran el 43% del consumo global. Es importante señalar que de los grandes productores solo Myanmar, China y Estados Unidos exportan este producto, China lo consume poco y Myanmar solo lo exporta. Brasil consume toda su producción e importa una pequeña cantidad, mientras que México importa esta leguminosa en proporción equivalente a Brasil.

En México se cultivan cerca de 70 variedades de *P. vulgaris* que se distribuyen en siete zonas diferentes del país. Sin embargo, su consumo ha disminuido a partir de los años sesenta cuando el registro anual era de 18,45 kg per cápita, mientras que se estimó en el 2013 de 10,2 kg (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera de México, [SIAP, 2104](#)).

I.3 *Phaseolus vulgaris* como leguminosa modelo

Se han generado diversas herramientas para la investigación de las bases moleculares del proceso de simbiosis con base al estudio de dos especies de leguminosas modelo, *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus* que presentan sistemas diferentes de nodulación de raíz. Posteriormente, *P. vulgaris* también fue considerada como planta modelo debido al tamaño relativamente pequeño de su genoma (estimado de 597-637 megapares de bases, Mb), el carácter diploide de su genoma y al hecho de que no presenta rearrreglos cromosomales complejos (comparados con los que se encuentran en otras leguminosas) en conjunto estas características permiten el análisis genético de esta especie. Además, su estrecha relación con otras especies de *Phaseolus sp.* (*P. acutifolius*, *P. coccineus* y *P. lunatus*) y con otras leguminosas [*Glycine max* (soja), *Cajanus cajan* (frijol de palo), *Vigna unguiculata* (caupi) y *Vigna radiata* (soja verde)] hace de *P. vulgaris* un buen modelo para estudios de genómica comparativa.

Existen diferentes herramientas e información genómica de *P. vulgaris* disponibles para estudiar la diversidad de la especie, tales como mapas de ligamiento, colecciones de marcadores, bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC, *Bacterial Artificial Chromosome*), un mapa físico y la secuencia del genoma completo ([McClellan et al., 2008](#); [Gepts et al., 2008](#)). Recientemente, se han secuenciado dos genomas, uno de una variedad criolla del acervo Andino (G19833) *BeanCap*, de 587 Mb con 30.638 loci predichos, <http://www.phytozome.net/commonbean.php> ([Schmutz et al., 2014](#)) y otro de una línea mejorada del acervo Mesoamericano (BAT93) *PhasIbeAm*, de 549,6 Mb con 30.491 loci <http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/phaseolus/> ([Vlasova et al., 2016](#)). Estudios de genómica facilitarán la obtención de más información sobre el origen, domesticación, evolución, adaptación y mejora de la especie, así como de las estrategias para su conservación.

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del Estado de México (Genesys, <http://www.genesys-pgr.org>) obtuvo miles de entradas de germoplasma de *P. vulgaris* procedentes de la colección del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Colombia. Esta colección se

encuentra en el Centro Nacional de Recursos Genéticos de México, en Jalisco. Este material estará disponible para su utilización en programas de mejora del cultivo.

P. vulgaris es un cultivo que ha sido recalcitrante a la transformación genética y a la regeneración. Sin embargo, se han desarrollado metodologías para la obtención de plantas compuestas con la parte aérea silvestre y raíces transgénicas mediante el uso de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*.

Cabe señalar que los transgénicos de *P. vulgaris* no conllevan riesgos de propagación presentes en otros cultivos como el maíz, debido a que *P. vulgaris* es una planta con alta autogamia y cuando se establece la floración, ésta ya está polinizada. Por lo tanto no es factible una fecundación por polen externo, ni que éste se libere al medio como polen transgénico.

I.4 La fijación biológica de nitrógeno y la simbiosis

El nitrógeno es un nutriente primario limitante en la producción de las plantas ([Graham et al., 2003](#)). Es sin duda uno de los macronutrientes más importantes requeridos por las plantas, siendo un componente esencial de las proteínas, porfirinas, alcaloides y los ácidos nucleicos. Sin embargo, la disponibilidad de nitrógeno se limita en muchos suelos, y aunque la atmósfera terrestre se compone de 78,1 % de nitrógeno molecular (N_2), las plantas no pueden utilizar esta forma de nitrógeno. El proceso por el cual el nitrógeno atmosférico se reduce a amoníaco (NH_3) se puede dar de manera industrial, a través de la reacción de Haber-Bosch, o biológica a través de microorganismos fijadores de nitrógeno conocidos como diazótrofos y constituyen el principal punto de entrada del nitrógeno atmosférico al ciclo del nitrógeno ([Howard y Rees, 1996](#)).

Los organismos capaces de fijar nitrógeno reducen el N_2 a NH_3 por medio de un complejo enzimático muy sensible al oxígeno llamado nitrogenasa ([Lee et al., 2014](#)). Esta enzima está presente tanto en bacterias de vida libre como en bacterias que establecen relaciones simbióticas. El término simbiosis (del griego: σύν, syn, 'juntos'; y βίωσις, biosis, 'vivir') fue descrito en 1897 por el botánico alemán Anton de Bary como "la vida en conjunción de dos organismos disímiles, normalmente en íntima asociación y por lo general con efectos benéficos para al menos uno de ellos" ([de Bary et al., 1897](#), citado por [Relman, 2008](#)). Las bacterias simbióticas establecen relación con otros organismos principalmente con plantas leguminosas y es referida como la fijación biológica del nitrógeno.

La familia de las leguminosas puede obtener nitrógeno a través de su asociación simbiótica con organismos procariotas fijadores de nitrógeno. Dicha asociación comprende a la mayoría de las especies de leguminosas y a las bacterias del Phylum

Proteobacteria, entre ellas las pertenecientes al género *Rhizobium*, que establecen relaciones simbióticas con plantas leguminosas como poroto de *P. vulgaris* (Geurtz y Bisseling, 2002). Una vez que se establece la simbiosis, las bacterias del género *Rhizobium* fijan nitrógeno atmosférico y lo proveen a su huésped.

Debido a que el nitrógeno es un factor limitante para el crecimiento y el desarrollo de las plantas, la capacidad de las leguminosas para establecer una simbiosis les proporciona una clara ventaja sobre otras especies de plantas. La simbiosis les permite lograr una adecuada nutrición acorde a su capacidad productiva y así las leguminosas dejan de ser dependientes en gran medida de la disponibilidad de nutrientes nitrogenados en el suelo.

La fijación biológica del nitrógeno es una alternativa al uso de fertilizantes. Las asociaciones simbióticas entre leguminosas y rizobios fertilizan el suelo y se calcula que incorporan aproximadamente 40 millones de toneladas de nitrógeno cada año (Udvardi y Poole, 2013).

I.4.1 La capacidad simbiótica de las leguminosas

La mayoría de las plantas terrestres desarrollan interacciones de mutualismo con los microorganismos del suelo, por las cuales ambos participantes obtienen beneficios. La planta recibe del microorganismo principalmente nutrientes, minerales (particularmente fosfatos) nitrógeno y agua, en tanto que éste obtiene de la planta hidratos de carbono y vitaminas (Parniske, 2008).

Las leguminosas desarrollaron simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* presentes en el suelo, las cuales fijan N_2 después de haberse establecido endosimbióticamente dentro de los nódulos de las raíces de la planta. Algunos rizobios pueden fijar nitrógeno atmosférico independientemente de su planta hospedera. La planta obtiene acceso a nitrógeno fijado por las bacterias, mientras que el microorganismo consigue un acceso privilegiado a las fuentes de carbono de origen vegetal. Esta capacidad de hacer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno hace de las leguminosas, como *Phaseolus vulgaris* (poroto), plantas de conveniente cultivo porque favorecen la recuperación de la fertilidad del suelo en siembras rotativas y pueden reducir significativamente el uso de fertilizantes nitrogenados para su desarrollo, estableciéndose de esta manera sistemas más productivos y sustentables.

I.5. La simbiosis rizobio-leguminosa y la formación del nódulo

Dentro de los organismos que forman simbiosis con plantas leguminosas están los que pertenecen a la familia *Rhizobaceae*, la cual está constituida por un grupo heterogéneo

de microorganismos gram negativos pertenecientes los géneros *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* y se denominan genéricamente rizobios. Se sabe que también existe simbiosis entre algunos géneros de plantas no leguminosas del género *Parosponia* con rizobios (Trinick, 1973; Akkerman *et al.*, 1978). Por otro lado, se han descrito nuevos géneros capaces de establecer simbiosis y formar nódulos con leguminosas, algunos pertenecientes al grupo de las α -proteobacterias y otros al grupo de las β -proteobacterias como *Burkholderia* y *Ralstonia* (Willems, 2006).

La simbiosis entre cada especie de leguminosa y de *Rhizobium* es específica. El género *Rhizobium* forma nódulos en las raíces de las leguminosas de origen templado, se caracteriza por un crecimiento rápido en vida libre, los genes relacionados con la fijación se encuentran en plásmidos y ha sido ampliamente estudiado por su importancia en la actividad agrícola y forestal.

La interacción entre los rizobios y las raíces de las plantas leguminosas compatibles, induce el desarrollo y la formación del nuevo órgano, el nódulo. Éste es una estructura especializada de la raíz derivada de las células de la corteza, dentro del cual las bacterias se establecen de forma intracelular. El sitio donde se diferencian en bacteroides y adquieren la capacidad de fijar el N_2 . Los nódulos tienen características anatómicas bien definidas donde se localizan los bacteroides y los haces vasculares de la corteza interna están conectados con aquellos de la raíz de la planta, lo cual facilita el transporte bidireccional de sustancias entre el nódulo y la planta huésped (Geurts y Bisseling, 2002).

Los nódulos de las leguminosas de climas tropicales y subtropicales como *Phaseolus vulgaris* se caracterizan por su forma esférica, por su actividad meristemática de tipo determinada y por transportar el N_2 fijado en forma de ureidos (alantoína o ácido alantoico) (Villalobos, 2006). En el nódulo, las bacterias están rodeadas por una membrana peribacteroidal que puede encerrar varios bacteroides. Por otro lado, los nódulos de leguminosas de climas templados como *Medicago truncatula*, son de tipo indeterminados, de forma alargada, poseen actividad meristemática apical, transportan el N_2 en forma de amidas principalmente y la membrana peribacteroidal encierra solamente un bacteroide (Vance, 1997).

I.5.1 El reconocimiento y el dialogo molecular simbiótico

Las plantas leguminosas pueden desarrollarse sin asociarse con rizobios durante todo su ciclo de vida. Sin embargo, en condiciones limitantes de nitrógeno el proceso simbiótico

inicia cuando la planta y los rizobios se reconocen a través de un intercambio de señales. Las raíces de las leguminosas liberan en la rizósfera compuestos fenólicos como los (iso) flavonoides, los cuales son percibidos por los rizobios, quienes en respuesta activan la expresión de los genes de nodulación (*nod*) a través del gen regulador *nodD* (Phillips y Kapulnik, 1995).

NodD es un factor de transcripción que se expresa constitutivamente pero al entrar en contacto con los flavonoides se activa, modifica su conformación y se une a los promotores bacterianos de los genes *nod*, los cuales codifican las enzimas que catalizan la biosíntesis y secreción de un tipo particular de lipo-quito-oligosacaridos conocidos como Factores Nod (FN) (Pieternel y Vanderleyden, 1995). Los FN producidos por estas bacterias activan una vía de señalización en las raíces de leguminosa huésped, donde promueven tanto la deformación del pelo radical, así como la división celular cortical (Broghammer *et al.*, 2012) y la nodulación (Oldroyd *et al.*, 2011) (Figura 2).

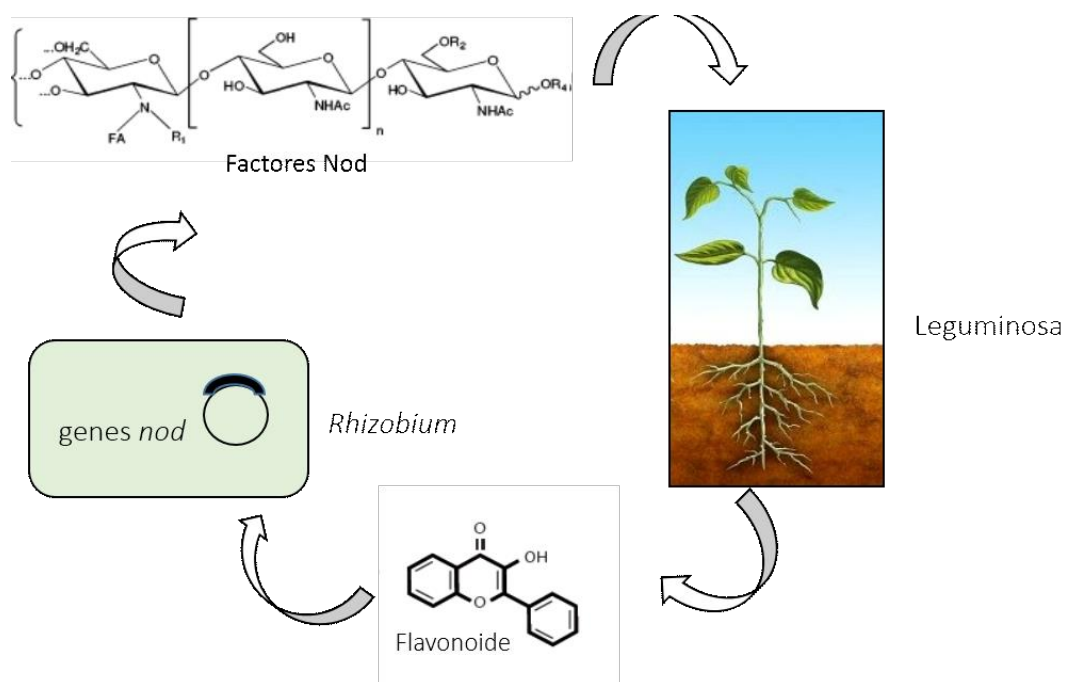


Figura 2. Esquema del proceso del reconocimiento entre la leguminosa y los rizobios.

La simbiosis inicia como un diálogo entre la planta y la bacteria a través de flavonoides exudados por la raíz, que activan los genes bacterianos para la síntesis de los Factores Nod, los cuales a su vez disparan la señal para inducir la nodulación de la planta hospedadora de forma específica.

Todos los FN tienen una estructura básica que consiste de un esqueleto de residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β-(1,4) (similares a los de la quitina) sustituido por una cadena de ácido graso en la posición C-2 del azúcar no reductor. Además puede

contener otros sustituyentes tanto en su extremo reductor como en el no reductor (Stougaard, 2001). El esqueleto de carbono puede presentar diversas modificaciones químicas que son específicas de cada especie y son las responsables de la compatibilidad entre la planta hospedadora y especies particulares de rizobio (Dénarié y Cullimore, 1993). La secreción de FN en conjunto con exopolisacáridos (EPS) y la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en la pared de la bacteria participan en el intercambio de señales que resultan en el establecimiento de la simbiosis (Downie, 2010). Se conoce que el tipo de flavonoide liberado por cada especie de leguminosa es específico para una especie determinada de rizobio (Pueppke y Broughton, 1999). Por su parte, los EPS y LPS tienen diferentes funciones según las plantas produzcan nódulos determinados o indeterminados. En general, los EPS parecen ser más necesarios en la infección de plantas con nódulos indeterminados mientras que el antígeno O de los LPS parece requerirse más para la infección de plantas que forman nódulos determinados (Frayse *et al.*, *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha observado recientemente que ciertos residuos del EPS de *Bradyrhizobium diazoefficiens* son necesarios para la infección de soja, que produce nódulos determinados (Quelas *et al.*, 2010). Además, todos estos polisacáridos parecen tener una función en la mitigación de la respuesta de defensa de la planta ante la infección por parte de los rizobios. (Skorupska *et al.*, 2006; Carlson *et al.*, 2010).

I.5.2 Respuesta inicial de la simbiosis, el enrulado del pelo radical

Cuando los pelos radicales de la raíz detectan los FN, se interrumpe el crecimiento simétrico polar y algunas veces se hincha la punta del pelo radical, el cual posteriormente reanuda su crecimiento para formar una especie de ramificación (Esseling *et al.*, 2003). Este cambio genera una pronunciada curvatura del pelo radical alrededor de la bacteria adherida, resultando en una estructura tipo “cayado de pastor (*shepherd’s crook*)” (Hadri y Bisseling, 1998). Las bacterias productoras de FN colonizan la curvatura del pelo radical denominado “bolsillo de infección” lo que permite iniciar el desarrollo del hilo de infección (Geurts *et al.* 2005) (Figura 3).

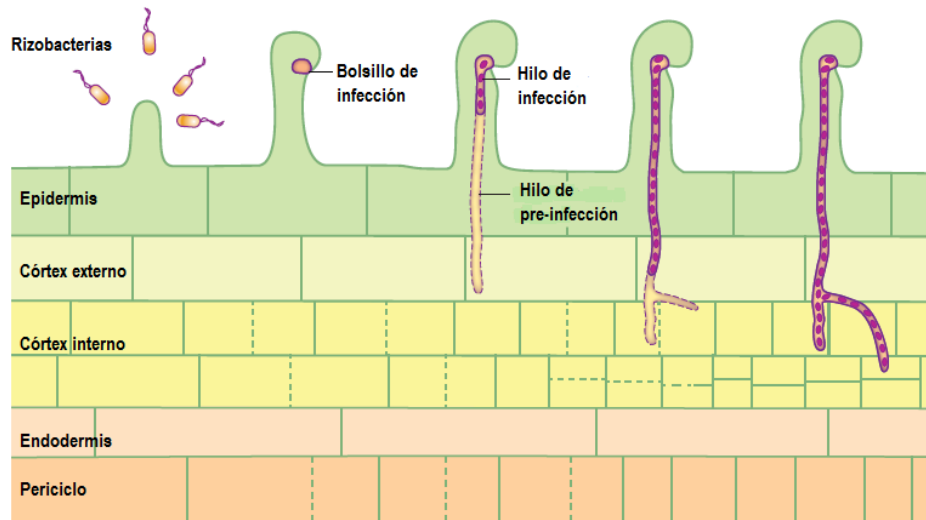


Figura 3. Etapas tempranas de la infección por rizobacterias, el enrollado del pelo radical y la formación del hilo de infección.

El proceso de infección de las rizobacterias ocurre coordinadamente con la actividad meristemática en las células del córtex. La bacteria libera FN que inducen su curvatura y desde ese sitio se inicia el bolsillo de infección que da lugar al hilo de infección. La ruta de crecimiento del hilo de infección está pre-establecida por los hilos de pre-infección y progresa hacia el interior del córtex donde el primordio de nódulo se ha formado a través de la división celular (líneas punteadas). La división celular en el córtex y en el periciclo inicia muy temprano y precede a la iniciación del evento de infección. (Modificada de [Oldroyd et al., 2011](#)).

I.5.3 La infección bacteriana y la organogénesis del nódulo

Durante la formación del nódulo radical ocurren dos procesos simultáneamente: la infección y la organogénesis del nódulo. Para que los rizobios puedan colonizar las células del parénquima de la raíz y más tarde establecerse en el nódulo deben atravesar las células de la epidermis y del córtex ([Geurts y Bisseling, 2002](#)). Es en el cortex donde las bacterias serán liberadas y posteriormente realizarán la fijación de nitrógeno ([Geurts y Bisseling, 2002](#)). Se sabe que en muchas leguminosas, los pelos radicales son la vía común de infección y las puntas de los pelos radicales que están emergiendo son los sitios preferidos de unión de los rizobios ([Emerich y Krishnan, 2014](#)). Así, la infección bacteriana vía los pelos radicales conduce a la formación de los hilos de infección ([Oldroyd et al, 2011](#)).

I.5.4 La formación del hilo de infección en el pelo radical

Los FN inducen el influjo de Ca^{2+} que se asocia con el foco de infección y probablemente con la reorientación del crecimiento del pelo radical hacia adentro, esto implica la invaginación de la pared celular de la planta con la extensión de la membrana plasmática

(Miwa, 2006). En el inicio del crecimiento del hilo de infección se propone que participan enzimas que degradan la pared celular sin causar la ruptura de la célula y se encuentran localizadas en el sitio de infección de las rizobacterias (Turgeon y Bauer, 1995; Ridge y Rolfe, 1985). Entre estas enzimas se encuentran las pectin-metiltransferasas y poligalacturonidasas, las cuales tienen funciones en la modificación de la pared celular.

Estas enzimas, que se inducen durante la infección por el rizobio, tienen homólogos expresados durante el crecimiento del tubo polínico, lo que sugiere una función de crecimiento polarizado (Muñoz, 1998; Rodríguez-Llorente *et al.*, 2004). En esta etapa se requiere de polisacáridos de la superficie bacteriana que pueden actuar como moléculas señalizadoras (Gibson *et al.*, 2008).

La dirección de crecimiento sostenido del hilo de infección dentro del pelo radical determina la migración del núcleo cerca del foco de infección conectado al hilo de infección a través de filamentos de actina y microtúbulos (Gage, 2004; Nutman, 1959). Las células corticales en división desarrollan el pre-hilo de infección, estructura que anticipa la dirección del crecimiento. Los hilos de infección forman un conducto parecido a un tubo que le permite a la bacteria dividirse y moverse desde la punta del pelo radical. Al avanzar a la célula cortical adyacente, se reposiciona su núcleo formando un puente citoplásmico para establecer el pre-hilo de infección (Brewin, 2004). Como se puede observar en la **Figura 4**, la formación y el mantenimiento del hilo de infección requiere de material de la pared celular, así como también del citoesqueleto y del tráfico vesicular que provea la materia prima para la síntesis de membrana plasmática, pared celular y proteínas (Oldroyd *et al.*, 2011).

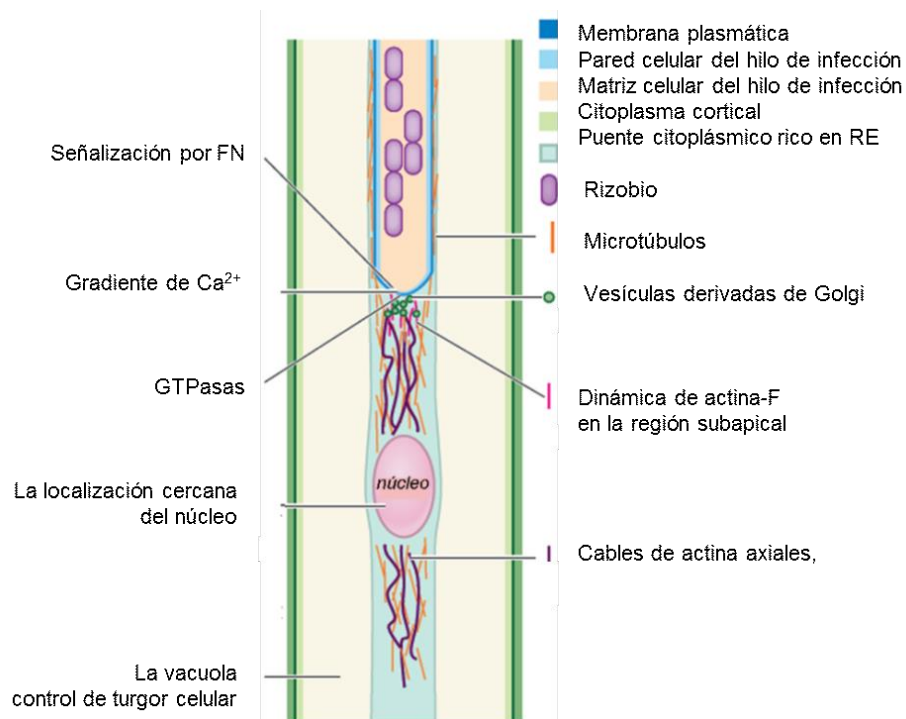


Figura 4. Modelo de crecimiento del hilo de infección del rizobio en los pelos radicales.

La formación del hilo de infección activa el influjo de Ca^{2+} en el ápice de éste, lo que afecta la flexibilidad de la membrana plasmática y la fusión de vesículas. La producción de especies reactivas de oxígeno, por parte de NADPH oxidasas, es inducida por los FN y es otro de los elementos requeridos para el crecimiento del hilo de infección. El citoesqueleto es esencial en el crecimiento del hilo de infección, los microtúbulos determinan la dirección del crecimiento hacia el sitio de influjo de Ca^{2+} . La actina filamentosa (Actina-F) provee la estructura para el transporte de vesículas y la migración del hilo de infección hacia el núcleo. Además, la estructura de actina-F y los microtúbulos son requeridos para la endocitosis y el reciclaje de subdominios de membrana plasmática, por tanto podrían regular la señalización mediada por proteínas de membrana. Las pequeñas proteínas G cumplen un importante papel en el crecimiento polar, regulando la dinámica de actina-F y el tráfico de vesículas (Modificada de [Oldroyd et al., 2011](#)).

El hilo de infección lleno con bacterias proliferantes crece y se extiende a lo largo del pelo radical hasta que se une a la pared celular (la cual se degrada) en la interfase con la célula cortical subyacente ([Vanbrussel et al., 1992](#)). El proceso de crecimiento del hilo de infección continúa a través de múltiples células corticales donde se ramifica y deposita las bacterias en el primordio de nódulo ([Oldroyd et al., 2011](#)).

I.5.5 La formación del nódulo

La organogénesis del nódulo requiere que los FN se unan a receptores tipo cinasa específicos que se encuentran sobre la membrana plasmática y que disparan una vía de señalización de calcio, la cual activa la transcripción de genes que están involucrados en el

desarrollo del nódulo (Broghammer *et al.*, 2012). Esta señalización dirige a la diferenciación y división de las células corticales de la raíz, la cual en algunas especies da origen a nódulos de tipo determinado como en el caso de *P. vulgaris*, *G. max* y *Vicia. spp.* En estas especies el primordio se origina de células corticales externas que dan lugar a un meristema transitorio (Figura 5).

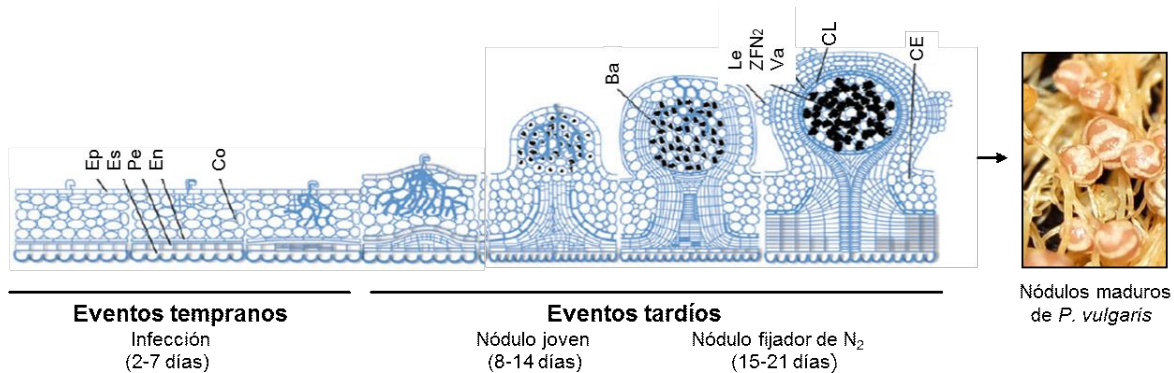


Figura 5. Eventos de las etapas de desarrollo de nódulos de tipo determinado.

En los eventos tempranos el rizobio entra por el pelo radical a través del hilo de infección que se forma en la epidermis de la raíz, al tiempo que se observan las células en división en la capa de células sub-epidérmicas. Las capas de células adicionales se dividen después, conduciendo a la formación del primordio de nódulo. En los eventos tardíos, los hilos de infección avanzan, se ramifican y se liberan en el primordio de nódulo. Se alojan en las células corticales dentro de simbiosomas donde se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno que requieren de una gran demanda energética. Continúa la invasión del rizobio y la maduración del nódulo. Los nódulos de tipo determinado como *P. vulgaris*, no desarrollan un meristemo persistente y por lo tanto todas las células invadidas están en una fase de desarrollo similar. **Ep**, epidermis; **Es**, estela; **Pe**, periciclo; **En**, endodermis; **Co**, cortex; **Ba**, bacteroides; **Le**, lenticelas; **ZFN₂**, zona de fijación de nitrógeno; **Va**, vasculatura; **CL**, capa de células límite; **CE**, capa escleroidal (modificada de Ferguson *et al.*, 2010).

En otras leguminosas como *M. sativa* (alfalfa), *M. truncatula* y especies de *Trifolium* (trébol) se producen nódulos de tipo indeterminado que son alargados y presentan uno o más meristemas persistentes, además se caracterizan porque el primordio del nódulo deriva de células corticales internas que originan el meristema persistente (Gibson, 2008). En ambos casos, la formación depende del desarrollo de la planta, no de la bacteria (Limpens, 2005).

Se ha sugerido que la organogénesis del nódulo además involucra alguna señal difusible, particularmente de auxinas y citocininas (Oldroyd *et al.*, 2011). Algunos de los genes de la planta que se inducen inicialmente en presencia de los FN y también durante el desarrollo del nódulo han sido referidos como nodulinas (Denancé *et al.*, 2014). De acuerdo a su

expresión espacio-temporal se clasifican en nodulinas tempranas (*ENODs*, *Early Nodulins*) antes de la fijación de nitrógeno y nodulinas tardías, después de iniciada la fijación de nitrógeno (Ehrhardt *et al.*, 1996; Catoira, 2000). Asimismo, los FN inducen la expresión de genes implicados en la remodelación del citoesqueleto, la pared celular y el ciclo celular (El Yahyaoui *et al.*, 2004; Lohar *et al.*, 2006).

I.6 El establecimiento de la simbiosis

Los rizobios se establecen en el primordio del nódulo mediante la formación de compartimientos membranales especializados en los cuales se hospedan intracelularmente. Estos compartimientos están formados por una membrana derivada de la planta, llamada membrana peribacteroidal, la cual rodea al rizobio (Geurtz y Bisseling, 2002). La membrana peribacteroidal representa una interfase simbiótica que facilita el intercambio de nutrientes y señales de una manera regulada.

A través de la membrana peribacteroidal se controla el flujo de carbono y nitrógeno desde y para los bacteroides, además del suministro de todos los elementos requeridos para el metabolismo bacteriano incluyendo fósforo, azufre, potasio, sodio, calcio, vanadio, hierro, molibdeno, níquel, cobalto y cofactores (Rosendahl *et al.*, 1991). El mecanismo de importe y exporte de una gran cantidad de señales y nutrientes se realiza a través de transportadores, pero se conoce poco acerca de éstos (Udvardi y Poole, 2013).

Los rizobios dentro de la membrana peribacteroidal se encuentran diferenciados morfológica y funcionalmente en bacteroides, constituyendo el simbiosoma que representa al compartimento celular especializado para la fijación biológica de nitrógeno bajo condiciones de anaerobiosis (Geurtz y Bisseling, 2002). Una característica de los rizobios es que la gran mayoría fijan nitrógeno únicamente cuando se diferencian en bacteroides y expresan al complejo de la nitrogenasa (Yang *et al.*, 1991). Otra característica de los bacteroides es que están rodeados de proteínas originadas a partir de ambos simbiontes (localizadas en el lumen del simbiosoma) y se denominan proteínas clandestinas (*moonlighting*). En su mayoría, estas proteínas participan en el metabolismo de carbono y algunas en el de nitrógeno (Emerich y Krishnan, 2014).

Los rizobios continúan dividiéndose algunas veces más dentro del simbiosoma, por lo cual puede haber más de un bacteroide por simbiosoma. Los simbiosomas continúan multiplicándose hasta que las células infectadas alcanzan miles de simbiosomas (Mergaeret *et al.*, 2006). Los cambios morfológicos y fisiológicos que sufren estas células simbióticas son principalmente: el aumento en el tamaño, la alta actividad metabólica y la endoreduplicación del ADN (lo que permite a la célula hacer muchas copias del genoma sin que haya división celular) para sostener la demanda energética de la fijación de

nitrógeno (Mergaeret *et al.*, 2006). Como los simbiosomas deben ser regenerados *de novo* durante cada ciclo de infección, se estima que también se requieren enormes cantidades de membrana para su desarrollo y mantenimiento (Bapaume y Reinhardt, 2012).

Se ha encontrado que la diferenciación terminal de la bacteria en bacteroide está mediada por factores específicos derivados de las plantas. Se han identificado algunos de estos factores como péptidos nódulo-específico ricos en cisteína (NCR, *nodule-specific cysteine-rich*), que sólo están presentes en el grupo monofilético de cladas sin invertidas repetidas (*Inverted Repeat-lacking Clade*, IRLC) de las leguminosas como alfalfa, pero están ausentes en las de nódulos determinados (Van de Velde *et al.*, 2010). Una vez que las rizobacterias se han diferenciado en bacteroides al interior de los simbiosomas, entran en una fase que se conoce como auxotrofia simbiótica, de tal forma que la planta controla la biosíntesis de sus compuestos esenciales (Prell *et al.*, 2010). Por ejemplo, la bacteria apaga la síntesis de aminoácidos ramificados solamente en simbiosis con la planta (Udvardi y Poole, 2013). De esta forma, los bacteroides se hacen altamente dependientes de la planta en muchos aspectos metabólicos.

Finalmente, los nódulos maduros fijadores de nitrógeno consisten de un tejido central que contiene células infectadas donde se ubican los simbiosomas y pueden ocupar hasta un 80% del volumen total de la célula. El nódulo contiene además de las células infectadas, células no infectadas, las cuales tienen diferentes funciones metabólicas, así como morfología y orientación espacial diferente (Emerich y Krishnan, 2014). Las pequeñas células no infectadas se encuentran intercaladas entre las grandes células infectadas rodeadas de tejido de floema y xilema que conectan con el sistema vascular de la raíz (Udvardi y Poole, 2013).

I.7 Factores involucrados en la señalización simbiótica

Por estudios clásicos de evolución y análisis filogenético se ha establecido que gran parte de la maquinaria de señalización para la nodulación es compartida o derivada simultáneamente de la ruta más antigua de la simbiosis de hongos arbusculares (HA) (Op den Camp *et al.*, 2011; Delaux *et al.*, 2013, 2014). Los componentes genéticos requeridos para la señalización inducida por los FN está conservada y es comúnmente referida como la ruta simbiótica común (*Sym Pathway*), la cual ha sido extensamente revisada en *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus* (Kosuta *et al.*, 2008) (Figura 6).

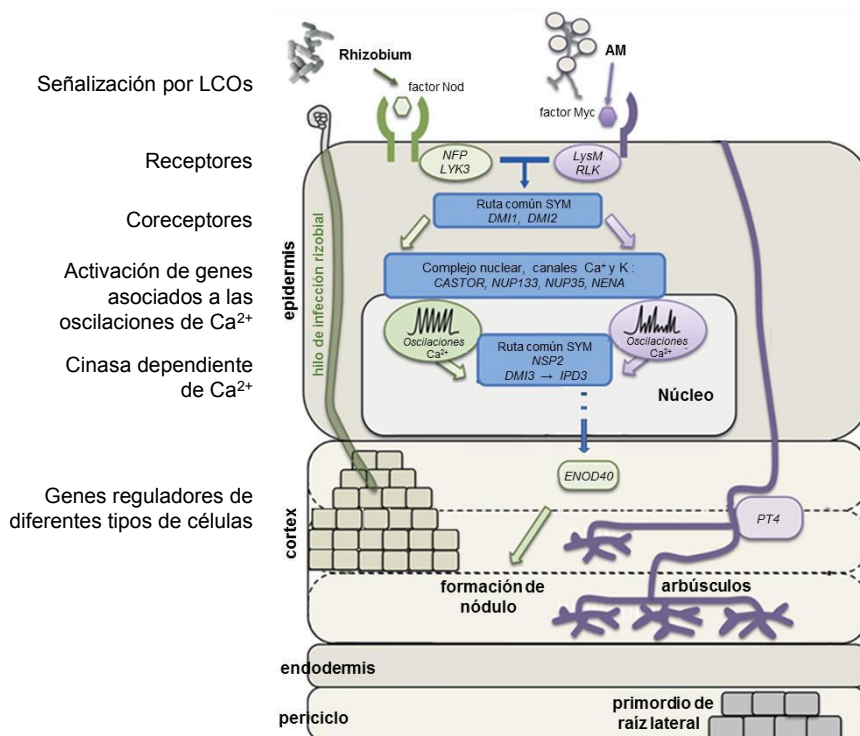


Figura 6. Componentes de la ruta simbiótica común en la señalización de los eventos que ocurren durante la interacción mutualista entre leguminosas con *Rhizobium* y con hongos arbusculares.

Los lipo-quito-oligosacáridos (FN y FMyc) son detectados de forma diferenciada por las cinasas tipo receptor localizadas en la membrana a través de sus dominios de lisina LysM (MtNFP = LjNFR5 (*Nod Factor Perception o Nod Factor Receptor 5*), MtLYK3 = LjNFR1 (*LysM domain receptor like kinase III o Nod Factor Receptor 1*) y LysM-RLK (*receptor like kinase with N-acetyl-glucosamine binding lysin motifs*). Se muestran los genes que pertenecen a la vía simbiótica común (Ruta Sym) (en azul). Hacia abajo de los receptores simbióticos, se activan genes asociados a las oscilaciones de calcio en la región perinuclear y los genes reguladores de señalización entre diferentes tipos de células, los genes de nodulación (en verde) y aquellos activados durante la interacción planta con hongos arbusculares (en púrpura). ENOD40 es un gen implicado en la formación de nódulos, en la aparición de los haces vasculares del periciclo, en particular en nódulos determinados y en la formación de raíces laterales. Los primordios de nódulos de tipo determinado se forman en células corticales que se dividen principalmente del cortex externo. El transportador de fosfato (PT4), se induce con la formación de arbusculos en el cortex. Se indican los genes SYM: MtDMI1 = LjPOLLUX, (*gen does not make infections*, también llamado POLLUX); MtDMI2 = LjSYMRK (*Symbiosis receptor-like kinase*), LjCASTOR, las nucleoporinas LjNUP85, LjNUP133 y LjNENA, MtNSP2 (*Nodulation Signaling Pathway 2*), MtDMI3 = LjCCaMK (*calcium calmodulin dependent serine/treonine protein kinase*, también llamado DMI3y) y MtIPD3 = LjCYCLOPS (*interacting protein of DMI3*), que han sido identificados y caracterizados en *Lotus japonicus* (Lj) y sus homólogos en *Medicago truncatula* (Mt) (Modificada de [Lagunas et al., 2015](#)).

Esta ruta también está funcionalmente conservada en arroz (Gutjahr y Parniske, 2013) y se han encontrado algunos de sus homólogos en briofitas y las carofitas (algas verdes del orden *Charales*), que se consideran próximas a las plantas terrestres (Delaux *et al.*, 2013).

Además se sabe que la red de señalización de esta interacción mutualista involucra cambios iónicos, GTPasas, especies reactivas del oxígeno y rearrreglos del citoesqueleto (Blanco *et al.*, 2009; Peleg-Grossman *et al.*, 2007; Montiel *et al.*, 2012; Marino *et al.*, 2011; Cárdenas *et al.*, 2000; Oldroy, 2013).

Los fosfoinosítidos también se han implicado en la señalización mediada por FN, sin embargo poco se sabe acerca de su papel en la modulación de la interacción simbiótica (Pingret *et al.*, 1998; Engstrom *et al.*, 2002; Charron *et al.*, 2004; Peleg-Grossman *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2009).

I.8 Los Fosfoinosítidos de plantas

En las células eucariotas el fosfatidilinositol (PI) es el principal sustrato empleado para la síntesis de los lípidos que contienen inositol (**Figura 7**). El PI es un lípido que representa del 5 al 30% de los fosfolípidos totales y solamente es superado por los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Antonsson, 1997).

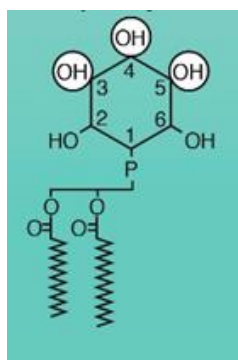


Figura 7. La molécula de PI.

Pertenece a una familia de lípidos que consiste en un grupo D-mio-inositol-1-fosfato unido por medio de un grupo fosfato a un diacilglicerol. El anillo de inositol tiene 5 grupos OH libres, los cuales pueden ser fosforilados en diferentes combinaciones, máximo en tres para producir fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato [PI(3,4,5) P₃]. Las posiciones dos y seis nunca tienen fosfatos. El PI y sus derivados fosforilados se conocen como los fosfoinosítidos y participan en vías de señalización celular (Modificada de Jean y Kiger, 2014).

El PI, aparte de ser un fosfolípido de membrana esencial, es un precursor importante de polifosfoinosítidos y esfingolípidos y está involucrado en el anclaje de proteínas de membrana plasmática. En levadura, este lípido se sintetiza en la membrana mitocondrial y en microsomas (Nikawa y Yamashita, 1997). Se encuentra en diferentes concentraciones en diferentes organelos, particularmente en el retículo endoplásmico hay más PI que donde es sintetizado (Antonsson, 1997).

El PI es un precursor de diferentes isómeros de polifosfoinosítidos fosforilados (PIPs) a través de la actividad de fosfatidilinositol cinasas, fosfatasas y fosfolipasas (Munnik *et al.*, 1998). Se han descrito siete derivados de PI fosforilados: los monofosfatos PI3P, PI4P y PI5P, los difosfatos PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, y el PI(3,5)P₂, y el PI3,4,5-trifosfato PI(3,4,5)P₃. Las plantas solo contienen seis tipos de PIP, los monofosfatos (PI3P, PI4P y PI5P), tres isómeros PIP₂ difosfatos [PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂ y PI(4,5)P₂] y a diferencia de las células animales, no poseen PIP₃ (Vanhaesebroeck *et al.*, 2010). Los PIPs median respuestas rápidas y temporales, actúan como señales, definen la identidad de la membrana y la polaridad celular en respuesta de las plantas al estrés y al medio ambiente. Los niveles de estos PIPs cambian después de la estimulación de la célula por diferentes factores de crecimiento, hormonas y algunos tipos de estrés (Munnik y Veermer, 2010) y participan en una variedad de procesos celulares incluyendo oscilaciones de calcio, rearreglos de actina, reorganización de microtúbulos y regulación del tráfico de membranas (Xue *et al.*, 2009).

Los derivados fosforilados (PIPs) funcionan como segundos mensajeros en el mecanismo de señalización a través de proteínas a las cuales se les unen diferencialmente para llevar a cabo una función específica. Estas proteínas contienen dominios de unión a lípidos, tales como el homólogo a pleckstrina (*pleckstrin homology, PH*), el dominio FYVE (dominio con dedo de zinc presente en las proteínas ricas en cisteína [*Fab1, YOTB, Vac1 y EEA1 (Early Endosome Antigen1)*] y Phox (*Phox homology, PX*), las cuales son reclutadas hacia diversas membranas celulares (Rameh y Cantley, 1999; Wurmser *et al.*, 1999; Ellson *et al.*, 2002).

I.9 El dominio FYVE se une específicamente al PI3P

El FYVE que contiene el dedo de zinc es un dominio pequeño de 70 residuos de aminoácidos que está evolutivamente conservado y se une al PI3P con alta especificidad. El dominio FYVE doblado consta de dos hojas beta antiparalelas de doble cadena y una α -hélice carboxi-terminal estabilizada por la unión a dos iones de zinc. Contiene tres regiones altamente conservadas, en el N-terminal la secuencia WxxD, los residuos de la "firma" básica del motivo [R (R/K) HHCRXCG] y en el C-terminal RVC que forma la región de unión al PI3P (Corvera *et al.*, 1999; Stenmark *et al.*, 1996; He J. *et al.*, 2010).

El dominio FYVE está presente en más de 30 proteínas diferentes de levadura, nematodos, plantas, insectos y de origen animal (Gaullier *et al.*, 1998). La mayoría de las proteínas que contienen el dedo FYVE están involucradas en endo y exocitosis, señalización intracelular, anclaje de citoesqueleto y sus blancos son membranas enriquecidas en PI3P. Por ejemplo entre los dominios FYVE más estudiados están el Hrs, (sustrato de tirosina cinasa regulada por el factor de crecimiento de hepatocitos) y el antígeno endosomal temprano humano (EEA1), este último funciona como una proteína de acoplamiento/inmovilización y es necesario para fusión homo y heterotípica de endosomas. Debido a su fuerte asociación con los endosomas tempranos, el EEA1 comúnmente se ha utilizado como marcador de estos compartimentos, mientras que Hrs está implicado en la transducción de señales y en el tráfico de proteínas endocíticas (He *et al.*, 2010). El reconocimiento entre PI3P y los dominios FYVE resulta en la translocación eficiente de estas proteínas normalmente citoplasmáticas a las membranas endosomales, lisosomales o vacuolares (He *et al.*, 2010).

Además, la interacción de proteínas que contienen el dominio FYVE con el PI3P regula el tráfico de proteínas y recluta proteínas al sitio de origen de membranas autofágicas (O'Farrel *et al.*, 2013). Por medio del uso de este dominio fusionado a proteínas fluorescentes se ha monitoreado el PI3P intracelular en endosomas, vacuolas y autofagosomas (vesículas de doble membrana) y se ha encontrado un enriquecimiento de PI3P en las membranas de estos compartimentos (Vermeer *et al.*, 2006; Gillyooly *et al.*, 2000; Obara K *et al.*, 2008; Mi *et al.*, 2015). Se ha diseñado un biosensor fluorescente para plantas que se une específicamente y con alta afinidad a PI3P: el dominio en tándem YFP-2x FYVE del Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) (Vermeer *et al.*, 2006). Este biosensor ha sido utilizado exitosamente para detectar PI3P en protoplastos de *Vigna unguiculata*, en cultivos de células BY-2 (*Nicotiana tabacum*), en estomas y en raíces de *Arabidopsis* (Vermeer *et al.*, 2006).

El PI3P se produce constitutivamente en la parte citosólica de membranas de los endosomas tempranos y funciona como una molécula de señalización cuando es reconocido específicamente por el dominio FYVE (He *et al.*, 2009). El PI3P se sintetiza en una reacción de fosforilación catalizada por la proteína de clasificación vacuolar VPS34, (*Vacuolar protein sorting*) en levadura (Schu *et al.*, 1993), también referida como fosfatidilinositol 3-cinasa en plantas leguminosas, la cual es un miembro de la familia de las fosfatidilinositol 3-cinasas.

I.10 La Familia de la fosfatidilinositol 3-cinasas y su clasificación

Las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K) son una familia de enzimas que catalizan la adición específica de un grupo fosfato a la posición tres del anillo inositol de los fosfoinosítidos. Estas enzimas se han encontrado en todos los tipos de células eucariontes y se han relacionado a un amplio rango de funciones celulares que incluyen crecimiento celular, proliferación, motilidad, sobrevivencia, transporte intracelular y autofagia (Fry, 1994; Rameh y Cantley, 1999; O'Farrell *et al.*, 2013).

Con base a su estructura, la especificidad por el sustrato y la subunidad a la cual se asocian, las PI3Ks se han clasificado en tres clases: las enzimas clase I (p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ), las enzimas clase II (PI3K-C2 α , PI3K-C2 β y PI3K-C2 γ) y una única enzima clase III: la proteína VPS34 (Domin y Waterfield, 1997) (Figura 8). Todos los miembros presentan algunos dominios comunes que son característicos de estas cinasas y difieren en otros que le confieren características de interacción con otras proteínas (O'Farrell *et al.*, 2013).

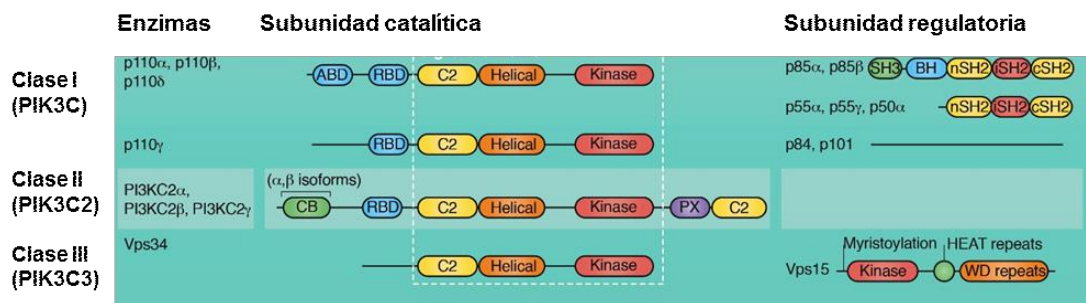


Figura 8. Clasificación de la familia PI3K.

En los miembros de las tres clases de esta familia se han identificado dominios característicos de las subunidades catalíticas así como sus respectivas subunidades reguladoras o accesorias. Las PI3K clase I son heterodímeros con una subunidad catalítica (p110 α , β y δ) y la subunidad reguladora o accesoria p85 α (o sus variantes procesadas p55 α y p50 α), p85 β , p55 γ , p101 o p84. Las PI3K clase II son isoformas monoméricas (PI3K-C2 α , β , γ) y las PI3K clase III poseen una subunidad catalítica VPS34 (*Vacuolar protein sorting*) y la subunidad reguladora VPS15. Todas las PI3Ks tienen ciertos motivos característicos: el dominio C2 (de interacción con membrana), el helicoidal y el de cinasa (línea blanca punteada). VPS15 contiene un dominio catalítico, un dominio repetido de calor (HEAT, *heat repeat*), un dominio WD esencial para la interacción con RAB5-GTP y en levaduras las proteínas de unión a nucleótidos de guanina1 α (Gp1 α) y un dominio de unión a la proteína relacionada con autofagia ATG14. Otros dominios importantes son: ABD, dominio de unión a p85; SH2, dominio de homología a Src2 (Sarcoma de Rous); SH3, dominio de homología a Src3; BH, dominio de homología a BCR (*Breackpoint cluster*); RBD, dominio de unión a RAS (*RAS-binding domain*) y dominio PX, dominio de homología a *phox* (*homology of two componentes of phagocyte NADPH oxidase*) (Modificada de Jean y Kiger, 2014).

Las PI3Ks de la clase I fosforilan al sustrato PI(4,5)P₂ *in vivo* para producir PI(3,4,5)P₃ y las PI3Ks de clase III fosforilan al PI para producir PI3P (**Figura 9**). Las PI3K clase II fosforilan al PI4P para producir PI(3,4)P₂, pero algunas evidencias sugieren que las PI3K de clase II también pueden fosforilar preferentemente al PI *in vivo*. Las preferencias diferenciales de sustrato y los modos de activación de los distintos tipos de PI3Ks tienen consecuencias importantes en sus funciones ([Lindmo y Stenmark, 2006](#)).

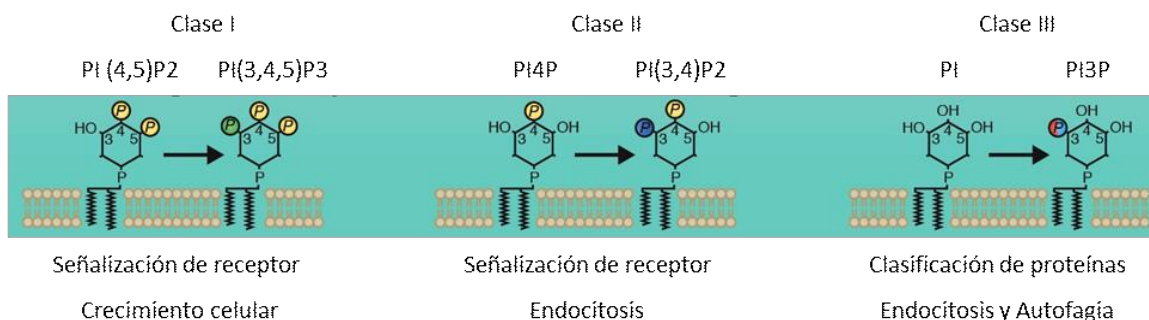


Figura 9. Actividad de las PI3Ks *in vitro*.

En células animales, estas enzimas regulan los niveles de PIPs, catalizando la transferencia del fosfato de la posición γ del ATP al grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo del PI, PI4P o PI(4,5)P₂, generando así el PI3P, el PI(3,4)P₂ o el PI(3,4,5)P₃, respectivamente. Abajo se indican las funciones de los PIs (Modificado de [Jean y Kiger, 2014](#)).

PI3K clase I

Es la clase más estudiada, las enzimas que conforman esta clase constan de una subunidad catalítica y una subunidad reguladora, en animales está presente en todo tipo de células. Se encuentran en el citosol en las células en reposo y por estimulación son reclutadas a las membranas a través de interacciones con receptores o proteínas adaptadoras ([Vanhaesebroeck et al., 2010](#)). Previamente, se consideraba que esta enzima se encontraba ubicada principalmente en la membrana plasmática; sin embargo, hay reportes de que las PI3K clase I están asociadas con membranas vesiculares y nucleares ([Rameh y Cantley, 1999](#); [Fry, 2001](#); [Katso et al., 2001](#)). En general el producto de su actividad, el PI(3,4,5)P₃, tiene la función de promover el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y adicionalmente se le atribuye una función supresora de autofagia ([Fry, 2001](#); [Katso et al., 2001](#); [O'Farrell et al., 2013](#)). Con base en su patrón regulatorio y en los mecanismos de activación, se subdivide en dos grupos que correlacionan con la capacidad de activarse a través de receptores celulares tipo cinasas de tirosina (*RTKs, Receptor tyrosin kinases*), de receptores transmembranales acoplados a proteínas G (*GPCRs, G protein-coupled receptors*) o a través de otras moléculas, todos asociados a una vía de señalización intracelular ([Vanhaesebroeck et al., 2010](#)).

La subunidad regulatoria (p85) le confiere a la catalítica (p110) estabilidad, inactivación de su actividad de cinasa en estado basal y reclutamiento a los receptores ([Vanhaesebroeck et al., 2010](#)). Las subunidades catalíticas p110 α , p110 β y p110 δ interactúan a través de su dominio de unión (ABD) con las regulatorias p85, p55, y p50. En este caso, la subunidad regulatoria p85, que actúa como adaptadora, la recluta a las tirosinas fosforiladas en receptores tipo tirosin cinasas (RTKs) a través de la unión específica de secuencia de aminoácidos del dominio SH2 para su activación ([Jean y Kiger, 2014](#)).

Los heterodímeros clase I que se forman entre la subunidad catalítica p110 γ y la regulatoria p101 o p84, debido a que no tienen dominios SH2, se activan casi exclusivamente por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Los GPCRs y la ruta de las cinasas de tirosinas, también pueden activar la GTPasa RAS y ésta a su vez activar algunos miembros de la PI3K clase I. Las PI3K clase I (p110 α , p110 δ y p110 γ), a través de su dominio de unión a la GTPasa RAS (RBD), se pueden activar por medio de RAS ([Vanhaesebroeck et al., 2010](#)). Mientras que la subunidad catalítica p110 β puede ser activada cuando interactúa con la GTPasa RAB5, implicada en la formación de compartimentos endosomales ([Christoforidis et al., 1999](#)). Además también se puede unir a otros miembros de la familia de las GTPasas ([Fritsch et al., 2013](#); [Guillerment-Guibert et al., 2008](#); [Dbouk et al., 2012](#)).

PI3K clase II

Las PI3K clase II tienen una isoforma monomérica (PI3K-C2 α , PI3K-C2 β y PI3K-C2 γ) con un dominio de unión a la GTPasa RAS (RBD) y un dominio de unión a clatrina (CB), que sugiere su unión a vesículas cubiertas de clatrina (proteína que recubre las microcavidades de membranas celulares donde se sitúan receptores de lipoproteínas). También contienen un dominio de homología a PHOX (PX), que le da selectividad por el sustrato PI(3,4)P₂ y un dominio catalítico característico de estas cinasas ([Falasca y Maffucci, 2012](#); [Vanhaesebroeck et al., 2010](#)). Parece estar predominante y constitutivamente asociada a membranas intracelulares en el citosol y posiblemente en el núcleo ([Jean y Kiger, 2014](#)).

Aunque se conoce que su actividad está controlada por los receptores RTKs y GPCRs, el mecanismo de activación se desconoce. Se cree que estas enzimas pueden ser activadas por estímulos externos, por ejemplo, por insulina e integrinas ([Brown et al., 1999](#); [Zhang et al., 1998](#)). La PI3K-C2 α está involucrada en el transporte de glucosa, la secreción de insulina y la endocitosis mediada por clatrina ([Falasca y Maffucci, 2012](#); [Postor et al., 2013](#)).

I.11 PI3K clase III

La PI3K clase III tiene una subunidad catalítica con tres dominios característicos, el C2 de unión a membrana, un dominio helicoidal y uno catalítico (Vanhaesebroeck *et al.*, 2010). Forma un heterodímero con la subunidad reguladora VPS15, la cual se une a las membranas intracelulares por medio de su miristoilación (Backer, 2008). Es la única enzima conservada desde eucariotas inferiores, plantas y mamíferos y representa a la PI3K más antigua (Lindmo y Stenmark, 2006).

La PI3K clase III se identificó por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae*, como Vps34, en un tamizado de genes involucrados en la clasificación endosomal de proteínas que van a la vacuola (Herman y Emr, 1990). Se sabe que VPS34 tiene especificidad de sustrato a partir de PI, para generar PI3P y requiere de la proteína cinasa VPS15 para su activación y asociación a la membrana (Schu *et al.*, 1993; Stack *et al.*, 1995a; Wumser y Emr, 2002). Vps34 codifica para una sola proteína, es la única que está presente en plantas y en levaduras y es responsable de la formación de todo el PI3P de la célula. En levaduras se conoce que sin la VPS34 funcional se observan defectos en el transporte del trans-Golgi a la vacuola (Schu *et al.*, 1993; Stack y Emr, 1994; Stack *et al.*, 1995b; Wumser y Emr, 1998). También se ha demostrado que PI3P juega un papel muy importante en eventos de tráfico de membrana (Corvera *et al.*, 1999; Stenmark y Gillooly, 2001).

No es claro que VPS34 se regule por estímulos extracelulares, pero hay evidencias de que su actividad puede ser regulada por nutrientes como aminoácidos, glucosa y por el receptor acoplado a proteínas G (GPCR) (Nobukuni *et al.*, 2005; Byfield *et al.*, 2005; Slessareva *et al.*, 2006).

Se han encontrado una variedad de complejos de proteínas regulatorias específicamente al agrupar PI3P de distintas membranas intracelulares (Backer, 2008). En levadura el complejo regulatorio VPS34 incluye tres componentes, VPS34, VPS15 y VPS30 (esta última conocida como BECLIN1/ ATG6). Estas proteínas forman el centro del complejo cuando se unen a la proteína relacionada con autofagia ATG14, lo que lleva a la formación del complejo I (Kihara *et al.*, 2001a), el cual se ha sugerido que desempeña un papel clave en el proceso de autofagia (Kametaka *et al.*, 1998). La autofagia es un proceso celular catabólico que involucra la entrega de los componentes citosólicos (incluye organelos enteros, macromoléculas y patógenos invasores) a la vacuola para su degradación y reciclamiento (Michaeli *et al.*, 2016).

Cuando el complejo regulatorio VPS34 se une a VPS38 forma el complejo II, que funciona en el tráfico celular (Klionsky y Ohsumi, 1999; Levine y Klionsky, 2004). Un tercer complejo

se forma cuando el heterodímero VPS34-VPS15 se une a la proteína de unión a nucleótido de guanina 1 α (Gp1 α), la cual está relacionada con la señalización a feromonas (Backer, 2008).

Con relación a las funciones primordiales de PI3K clase III, se ha reportado que regula el tráfico de membrana con el papel principal en la clasificación de proteínas endosomales, formación de autofagosomas, flujo de autofagia y citocinesis (Backer, 2008; Simonsen y Tooze, 2009; Nezis *et al.*, 2010; Raiborg *et al.*, 2013). Estudios recientes involucran la autofagia en muchos aspectos de la vida de las plantas, que incluyen el establecimiento de la semilla, el desarrollo, el estrés, el metabolismo y la reproducción (Michaeli *et al.*, 2016). La autofagia en eucariontes es un mecanismo común de degradación de componentes celulares tanto durante el estrés como en condiciones favorables (Reggiori y Klionsky, 2013). El tipo de autofagia que está mediada por la formación de vesículas *de novo* que engullen (engloban) la carga citosólica y la entregan a la vacuola se llama macroautofagia y es a la que haremos referencia en este trabajo.

I.12 PI3K clase III participa en la formación del autofagosoma en plantas.

En particular, la macroautofagia ("*self-eating*", aquí referida como autofagia) está mediada por la formación de un autofagosoma, que es una estructura de doble membrana encargada de transportar la carga a la vacuola (Figura 10). En el proceso de fusión del autofagosoma con la vacuola se forma el cuerpo autofágico que se libera dentro de la vacuola. Posteriormente, estos cuerpos se cortan por hidrolasas y los productos se exportan al citoplasma para su reutilización. La maquinaria para llevar a cabo el proceso de autofagia se describió inicialmente en levadura donde se conocen alrededor de treinta proteínas conservadas con autofagia (*Autophagy-related –ATG- proteins*), de las cuales veinticuatro se han encontrado en *Arabidopsis*, sugiriendo que el mecanismo es similar en plantas (Bassham *et al.*, 2006). Las ATGs se han dividido en grupos funcionales: la iniciación, la nucleación, la elongación y digestión y reciclaje de componentes.

Al inicio del proceso, el complejo de la cinasa ATG1 se asocia con ATG13 que a su vez se ensambla con los factores accesorios ATG11, ATG17 y VAC8 para generar un complejo activo (Matsuura *et al.*, 1997; Funakoshi *et al.*, 1997). Esta interacción está regulada por la cinasa TOR (*target of rapamycin*). En células que crecen en condiciones ricas en nutrientes, TOR se activa inhibiendo la formación del complejo ATG1-ATG13 por medio de la fosforilación de las mismas. Por el contrario en estados de privación de nutrientes, TOR se inactiva y cuando ATG1 se une a ATG13 defosforiladas, se activa la autofagia (Kamada *et al.*, 2000) (Figura 10). Luego de la activación del complejo ATG1, se incluyen otras ATGs

formando un complejo pentamérico (ATG13, ATG17, ATG29 y ATG31). El ensamble de este complejo es la primera etapa que desencadena el reclutamiento de otros complejos para la formación del autofagosoma. El complejo ATG1 promueve la vesiculación autofágica por medio de la activación directa o indirecta del complejo PI3K que está compuesto de VPS15-ATG6/BECLINA1-ATG14 el cual está asociado a la proteína transmembranal ATG9. El complejo PI3K genera PI3P, componente mayoritario de las membranas autofágicas, recluta otras proteínas de unión a PI3P al sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS). Esta etapa de nucleación durante la formación del PAS, es bloqueada por los inhibidores (Wortmanina y LY294002) de la actividad de PI3K (Thompson y Vierstra, 2005). (Figura 10). Los complejos ATG1-ATG13 y PI3K regulan la formación de vesículas a través de unas etapas de tipo ubiquitina (Xie y Klionsky, 2007).

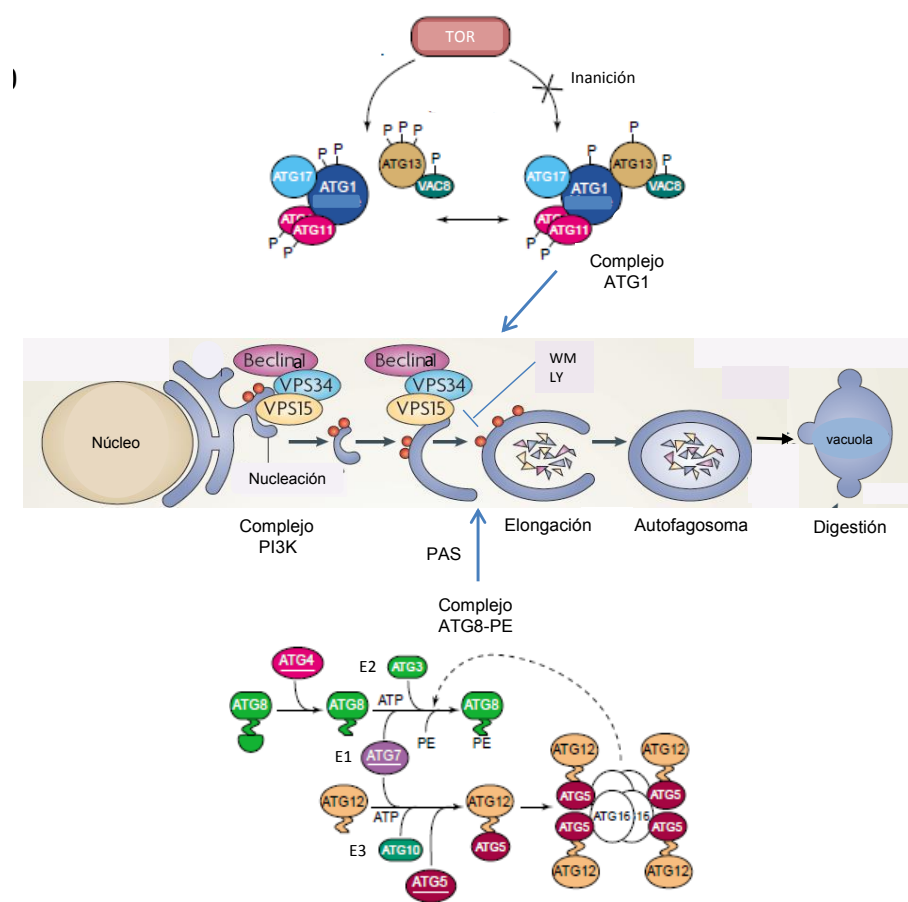


Figura 10. Formación de vesículas autofágicas.

Esquema de los principales complejos que participan en la autofagia. E1, enzima activadora; E2, enzima conjugante y E3, enzima ligasa. El mecanismo se detalla en el texto (Modificada de Vanhaesebroeck *et al.*, 2010).

En la elongación del fagóforo como doble membrana para formar el autofagosoma maduro, se involucra dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina que involucran a ATG8 y ATG12 (revisado por [Liu y Bassham, 2012](#)). ATG12 debe ser activada para poder conjugarse a ATG5, la proteína encargada de hacerlo es ATG7; una vez activada es transferida a ATG5 por ATG10 para formar el heterodímero ATG5-ATG12, al cual se une ATG16 y se forma un complejo que se asocia a la membrana del pre-autofagosoma. El segundo sistema tipo ubiquitina, ATG8 es sintetizado como un precursor que es procesado por ATG4 para exponer un residuo de Glicina, necesario para su posterior conjugación, esta isoforma es activada por ATG7 y conjugada a la fosfatidiletanolamina (PE) con la ayuda de ATG3 para formar ATG8-PE (**Figura 10**). El complejo PI3K está involucrado en la asociación a la membrana de elongación del sistema de conjugación ATG12-ATG5-ATG16 que regula la conjugación de la proteína ATG8 a la PE ([Nakatogawa et al., 2007](#); [Klionsky et al., 2007a](#)), este sistema dirige la fusión y elongación del autofagosoma ([Xie et al., 2008](#)).

La formación del conjugado ATG12-ATG5 precede a la formación del conjugado ATG8-PE e incrementa su reacción de lipidación. El reclutamiento de ATG8 ocurre tanto en la cara interna como en la cara externa de la vesícula autofágica en elongación, ATG8 de la cara externa puede ser removida por ATG4, el de la cara interna se mantiene unido hasta la fusión de la vesícula autofágica con la vacuola, cuando es degradado junto con el material secuestrado; por ello, la detección de ATG8 es un buen marcador de la macroautofagia ([Xie y Klionsky, 2007](#)).

La fusión del autofagosoma al tonoplasto se acompaña del sistema de tráfico vesicular y la digestión del cuerpo autofágico se lleva a cabo por hidrolasas que incluye la lipasa ATG15, proteasas y peptidasas, nucleasas y glucanasas que podrían cumplir ese papel ([Marty, 1999](#)).

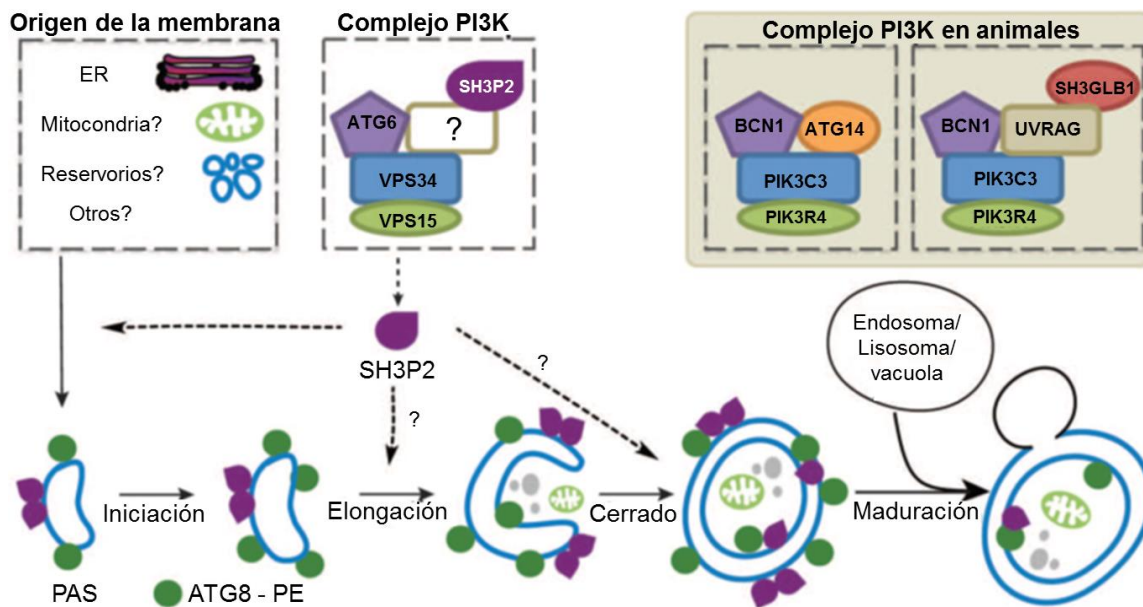


Figura 11. Participación del Complejo PI3K en la formación del autofagosomas en *Arabidopsis*.

El Complejo PI3K conformado por VPS34/PI3K, /BECLINA1/ATG6 y VPS15 se asocia a la proteína P2 con dominio SH3 (SH3P2) a través de un factor que todavía no está identificado (caja con signo de interrogación). A través de la interacción con el complejo participa en el tráfico de SH3P2 al fagoforo/estructura preautofágica (PAS). SH3P2 probablemente es responsable de la deformación de la membrana de origen del retículo endoplásmico (de otras fuentes posibles como la membrana de las mitocondrias, o membranas provenientes de otros organelos, señaladas con signos de interrogación). El complejo PI3K participa activamente en las etapas de inicio, elongación y maduración durante la formación del autofagosoma en las plantas. De forma comparativa, el modelo actual de los complejos PI3K en animales y sus componentes conocidos en la regulación de la formación del autofagosoma, se muestran en cuadros sombreados de la derecha (Figura modificada de Zhuang y Jiang, 2014).

Las etapas tempranas de la formación del autofagosoma no se han definido bien en plantas y como se mencionó algunas de estas proteínas (ej. ATG14) tampoco se han identificado en plantas. Sin embargo recientemente en *Arabidopsis thaliana* se han reportado avances en este sentido, se ha propuesto la participación de ATG5, localizada en la membrana del retículo endoplásmico para reclutar ATG8 al fagóforo en crecimiento (Le Bars *et al.*, 2015). Otra novedosa proteína que no es ATG, la SH3P2 (SH3 domain protein 2), se une a PI3P, al complejo PI3K y a ATG8 facilitando la biogénesis del autofagosoma (Figura 11). La proteína SH3P2 contiene un dominio BAR (*N-Bin-amphiphysin-Rvs*), implicado en la remodelación de la membrana y en la interacción con ATG8, la cual facilita la deformación de la membrana durante desarrollo del autofagosoma (Zhuang *et al.*, 2013).

En resumen, la síntesis de PI3P por el complejo PI3K/Vps34 recluta proteínas hacia las membranas que interactúan con este fosfoinosítido y dirige una cascada de señalización que lleva a la formación de un autofagosoma.

I.13 Posible relación con el proceso simbiótico

Durante la nodulación se ha reportado que PI3K es un regulador importante de la interacción entre plantas y bacterias del suelo. En soja (*Glycine max*) se han encontrado dos isoformas de PI3K expresadas de manera diferencial en raíces y nódulos; además, ha sido asociada a la proliferación de la membrana celular (Hong y Verma, 1994). Adicionalmente, tanto en *G. max* como en *M. truncatula*, se ha reportado que los niveles de transcripción de PI3K aumentan durante la interacción simbiótica (Hong y Verma, 1994; Hernández *et al.*, 2004; Peleg-Grossman *et al.*, 2007; Roux *et al.*, 2014).

Se ha reportado la función de PI3P y PI3K/Vps34 en el crecimiento y desarrollo normal de la planta (Welters *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2008b), así como también en otros procesos fisiológicos como autofagia y simbiosis (Liu *et al.*, 2005; Peleg-Grossman *et al.*, 2007). En *A. thaliana*, las plantas que expresan un antisentido de *AtVps34* no se desarrollan y con frecuencia las plantas mueren con defectos pleiotrópicos, lo que indica que la pérdida de la función de PI3K es letal y esencial para el crecimiento y desarrollo (Welters *et al.*, 1994).

Por otro lado, la proteína VPS15 (subunidad regulatoria de la actividad de PI3K/VPS34) junto con las proteínas accesorias VPS30/ BECLINA1 y ATG14, forman parte de un multicomplejo proteico requerido para autofagia en levadura (Stack *et al.*, 1993; Stack *et al.*, 1995; Kametaka *et al.*, 1998; Kihara *et al.*, 2000a). En *P. vulgaris* se encontraron los genes ortólogos correspondientes a estos genes, excepto para el gen ATG14, el cual no se ha reportado en plantas (Levine y Klionsky, 2004). Sin embargo se sabe que tanto el complejo de PI3K y el producto de su actividad, el PI3P, son cruciales para la iniciación del proceso de autofagia.

Debido a que la función de PI3K y los fosfoinosítidos ha sido relacionada al proceso de nodulación y la actividad de PI3K/VPS34 es indispensable en el proceso de autofagia, surge la propuesta de investigar la relación entre PI3K y autofagia en el proceso de simbiosis entre *P. vulgaris* y los rizobios.

I.14 Métodos de estudio de la función de PI3K

El estudio de la función de PI3K se ha basado en el uso de inhibidores de la actividad de esta enzima. Los inhibidores Wortmanina (WM) y LY294002 (LY), estructuralmente distintos y permeables a la célula, presentan inconvenientes debido a diferencias en especificidad y a que los rangos de sensibilidad son relativos dependiendo del tipo de célula que se trate (ej. levadura o humana). La actividad de PI3K se bloquea con LY (en rango micromolar bajo) y con la WM (en rango nanomolar bajo). Estos inhibidores parecen ser altamente selectivos; sin embargo, los efectos se deben interpretar cautelosamente, ya que algunos reportes indican que algunas isoformas de fosfatidil inositol-4 cinasa y fosfolipasa A2 también pueden ser sensibles a WM. Los métodos para medir actividad de PI3K *in vitro* tienen sus limitaciones, son laboriosos y costosos y no proveen información acerca de la localización de los lípidos sintetizados por esta enzima. Específicamente en estudios realizados en raíz, se conoce que el LY inhibe el crecimiento de los pelos radicales de forma dosis dependiente (2 a 30 μM) (Lee *et al.*, 2008a) y se ha observado que durante un tiempo corto de tratamiento (2-10 min) con LY se altera la arquitectura del pelo radical, lo que lleva a la inducción de una protrusión de la vacuola en la región apical (Lee *et al.*, 2008a). Este hallazgo sugiere que también es importante para otros componentes de la señalización en los pelos radicales, tales como la dinámica de actina, la actividad de pequeñas proteínas G, el tráfico intracelular y la formación de especies reactivas del oxígeno (Lee *et al.*, 2008a).

Otras alternativas empleadas para estudiar las posibles funciones de PI3K se han dirigido a la obtención de mutantes de esta enzima. En el trabajo realizado por Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 2008b), los autores buscaban obtener mutantes de *A. thaliana* que no expresaran el gen VPS34, el cual codifica para la enzima PI3K. Sin embargo, la mutación homocigota fue letal debido a defectos gametofíticos, además otro inconveniente fue que las plantas heterocigotas no fueron discernibles de las plantas silvestres (Lee *et al.*, 2008b).

Con el fin de estudiar las posibles funciones de PI3K en el proceso de nodulación, nuestro grupo de investigación realizó varias construcciones para obtener las proteínas de fusión, con glutation-s-transferasa (GST-PvPI3K) y 6 histidinas-PvPI3K (His-PvPI3K) expresadas en bacterias y en baculovirus, respectivamente. Estas proteínas de fusión presentaron gran dificultad en la purificación y en el manejo debido a la inestabilidad de los extractos proteicos. Adicionalmente, no fue posible obtener anticuerpos anti-PvPI3K en ratón ni en conejo.

Dado que los inhibidores químicos de las enzimas pueden tener efectos sobre otras moléculas y vías de señalización y que la mutación homocigota de VPS34 es letal, es de interés desarrollar otro sistema que permita estudiar la función de PI3K y del fosfoinosítido PI3P. Por estas razones y con el propósito de conocer la participación de PI3K en el proceso de autofagia durante la simbiosis nodular de *P. vulgaris*, en este trabajo se planteó la estrategia de disminuir la expresión de la enzima PI3K por medio de genética reversa con un RNA de interferencia (RNAi) y monitorear con una sonda fluorescente el producto de su actividad.

I.15. Hipótesis

La enzima PI3K y el producto de su actividad, el PI3P, participan en el establecimiento de la interacción simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. tropici*, en conjunto con las proteínas del complejo que funcionan en autofagia.

I.16. Objetivos

I.16.1. General

Durante la asociación simbiótica entre las leguminosas y los rizobios se requiere de un conjunto de genes de la planta y de la bacteria que tienen funciones específicas en el establecimiento de la simbiosis que conduce al desarrollo del nódulo, el órgano de la planta especializado en la fijación biológica del nitrógeno.

Uno de los genes que se induce en los tejidos simbióticos de *P. vulgaris* es el que codifica para la PI3K. Esta proteína participa vía el producto de su actividad, el PI3P cuando se asocia con BECLINA1 y VPS15 para formar un multicomplejo proteico (PI3K/VPS34, BECLINA1/ATG6 y VPS15) que funciona específicamente al inicio de la autofagia. En las plantas la autofagia funciona como un sistema de reciclamiento celular para el metabolismo adecuado y la asignación de nutrientes, sugiriendo que PI3K debe tener una regulación en la simbiosis a través de este proceso.

El objetivo de este trabajo es conocer el papel que desempeña la PI3K en la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici* mediante el estudio de los efectos provocados en el fenotipo por la pérdida de la función con un RNAi, en la localización de PI3P, la cuantificación de los niveles de transcrito de los componentes que conforman el centro del complejo PI3K y del marcador de la formación de autofagosomas, *Atg8* (el gen relacionado con autofagia *Atg8*).

I.16.2 Específicos

1. Determinar el comportamiento de los niveles de transcrito de PI3K durante la simbiosis de *P. vulgaris* y determinar su expresión en los tejidos de la raíz.
2. Analizar el fenotipo de *P. vulgaris* inducido con pérdida de la función de PI3K en la etapa inicial de la simbiosis, durante la entrada de *R. tropici* al pelo radical y en la nodulación de la raíz.
3. Determinar la presencia de PI3P durante los eventos de la infección por *R. tropici*.
4. Cuantificar los niveles de transcrito de los componentes que participan en autofagia, del núcleo del complejo PI3K y de Atg8 durante la pérdida de la función de PI3K en *P. vulgaris*.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Cepas utilizadas en este trabajo

Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo (**Tabla 1**), una vez alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, se conservaron en criotubos con solución acuosa de glicerol estéril al 80% (v/v) a una concentración final de 25% (v/v). Se incluyeron los antibióticos de resistencia correspondiente de cada cepa a la concentración indicada. Los criotubos fueron almacenados a -80 °C.

Tabla 1		
Cepas <i>E. coli</i>		
Cepa	Genotipo y antibiótico de selección	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5a	F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17 (rk-, rk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1 Cm 35 µg/mL, Km 50 µg/mL y Sp 50 µg/mL	Taylor <i>et al.</i> , 1993
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1, nupG . Sm 50 µg/mL	Invitrogen
DB3.1	alelo gyrA462, resistente a efectos tóxicos del gen ccdB. Sm 50 µg/mL	Invitrogen
Cepa utilizada para la transformación de <i>P. vulgaris</i>		
<i>A. rhizogenes</i> K599	Cepa NCPP2659	Bond y Gresshoff, 1993
Cepas de rizobios		
<i>R. tropici</i> CIAT899	Nx 20 µg/mL, Ra 50 µg/mL y CaCl ₂ 7 mM	Laboratorio. Dra. Carmen Quinto – IBT (UNAM)
<i>R. tropici</i> CIAT899-GFP	Nx 20 µg/mL, Ra 50 µg/mL, Tc 10 µg/mL y CaCl ₂ 7 mM Expresa GFP	Biol. Olivia Santana Laboratorio. Dra. Carmen Quinto – IBT (UNAM)
<i>R. tropici</i> CIAT899- DsRed	Nx 20 µg/mL, Ra 50 µg/mL, Tc 10 µg/mL y CaCl ₂ 7 mM Expresa Ds-Red	Biol. Olivia Santana Laboratorio. Dra. Carmen Quinto – IBT (UNAM)

IBT: Instituto de Biotecnología. UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México
Cm: cloramfenicol, Sp: espectinomicina, Sm: estreptomycin, Km: Kanamicina, Nx: ácido nalidixico
Ra: rifampicina, Tc: tetraciclina.

II.2 Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la **Tabla 2**.

Plásmidos	Características relevantes	Fuente
pENTR™/D-TOPO®	Plásmido Gateway direccional de entrada	Invitrogen
pBGWFS7,0	Análisis de promotor con reporteros transcripcionales	Karimi <i>et al.</i> , 2002
proPvPI3K:GFP-GUS	Promotor de PvPI3K fusionado a GFP-GUS	Cruz, 2011
pTDT-DC-RNAi	Expresión de RNA en estructura tallo-asa	Valdés <i>et al.</i> , 2008
pTDT-PvPI3K-RNAi	Silenciamiento de PvPI3K	Este trabajo
pTDT-Beclina1-RNAi	Silenciamiento de PvBeclina1	Cruz, 2014
pEarleyGate104	Proteína fusionada con EYFP en el C-terminal	Universidad de Gent
pGreen35S:YFP2xFYVE	Dominio 2xFYVE de Hrs de ratón	Dr. Munnick T
pBluescript	Vector de clonación estándar, expresión bacterial	Acceso, X52329.1
pZErO®-2	Ligadura de fragmentos de PCR con extremos romos	Invitrogen

La información del plásmido de expresión pEarleyGate104 (CD3686) está disponible en: http://www.arabidopsis.org/abrc/catalog/vector_1.html. Para el plásmido pBGWFS7,0 del VIB, Department of Plant Systems Biology, University of Gent, www.psb.ugent.be

II.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Medio LB (Luria-Bertrani, de acuerdo a [Miller, 1972](#))

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* y *A. rhizogenes*.

Composición: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L. Para los medios sólidos, se agregó 10 g/L de agar.

Medio PY

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *R. tropici* CIAT899

Composición: bactopectona 5 g/L, extracto de levadura 3 g/L, CaCl₂ H₂O 0,7 g/L.

Medio S.O.C. (para 1L)

2% Bactotripton	20 g
0,5% Extracto de levadura	5 g
10 mM NaCl	0,58 g
25 mM KCl	0,19 g

Se llevó a 980 mL con agua destilada, se autoclavó 20 min y se añadieron las siguientes soluciones esterilizadas (por separado) en filtro millipore antes de aforar.

20 mM de glucosa	20 mL 1 M
10 mM Mg Cl ₂	10 mL 1 M
10 mM MgSO ₄	10 mL 1 M

Las cepas de *E. coli* DH5 α , TOP10 y DB3.1 fueron crecidas en medio LB líquido a 37°C y 250 rpm de agitación, o en cultivos sólidos en placas de Petri con medio LB adicionado con agar. La cepa de *A. rhizogenes* se sembró en medio LB líquido o sólido suplementado con los antibióticos respectivos a 30°C y con agitación a 250 rpm en caso de crecimiento en medio LB líquido. La cepa de *R. tropici* CIAT899 fue crecida en placas de Petri con medio PY sólido o líquido, suplementado con los antibióticos correspondientes a 30°C y a 250 rpm.

II.4 Soluciones

Tabla 3
Solución B&D (Broughton y Dilworth, 1971)

Elemento	Forma	Concentración Final (μM)
Ca	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1000
P	KH_2PO_4	500
Fe	Citrato de hierro	10
Mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
K	K_2SO_4	1500
S		500
Mn	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1
B	H_3BO_3	2
Zn	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
Cu	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2
Co	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
Mo	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1

Para suplementar con nitrógeno se añadió KNO_3 2mM final.

Purificación de DNA genómico (Método modificado de [Saghai-Marroof et al., 1984](#))

Solución de aislamiento de DNA.

Sarkosil 1%	1,0 g
NaCl 0,8 M	4,7 g
EDTA 0,22 M (pH 8,0)	4,4 mL (0,5 M)
Tris-HCl 0,22 M (pH 7,8)	11,0 mL (2 M)
CTAB 0,8%	0,5 g
Manitol 0,14 M	2,55 g
β -mercaptoetanol (14 μ l/10 mL)	140 μ l

CTAB: cetil trimetil amonio bromuro
DEPC: Dietilpirocarbonato

Extracción de RNA (método de [Chomczynski y Sacchi, 1987](#))

		Concentración final
Tiocianato de guanidina	250 g	4 M
Citrato de sodio 0,75 M	17,6 mL	25 mM
Sarkosyl 10%	26,4 mL	0,5 %
H ₂ O DEPC	293,0 mL	
β -mercaptoetanol (7,2 μ l/ mL)	3,6 mL	

Acetato de Sodio-3H₂O 2 M (pH 4,1)

Se disuelven 13,6 g en 30 mL de agua DEPC y se ajusta el pH con ácido acético (aprox. 14,7 mL).

Citrato de sodio 0,75 M (pH 7,0)

Se disuelven 11,02 g en 40 mL de agua, se ajusta el pH con ácido acético y se afora a 50 mL.

II.5 Oligonucleótidos usados en este trabajo

Gen	Nombre	Secuencia de los oligonucleótidos (5'--- 3')	Referencia
Para RT-PCR			
Aquaporina	<i>PvAq_F</i> <i>PvAq_R</i>	CGC-CGC-TGT-TTG-AGC-CCT-CG TTG-CGC-ATC-GTT-TGG-CAT-CG	Campos, 1987
Fosfatidilinositol 3- cinasa	U1PI3K L2413PI3K	ATG-ACC-GGT-AAC-GAG-TTT-CGC CCG-CCA-ATA-TTG-AGC-CCA-ACG	Este trabajo
Para RT-PCR <i>in situ</i>			
Fosfatidilinositol 3- cinasa	<i>PvPI3K_F</i> -780 <i>PvPI3K_R</i> -1646	GCT-GGC-TAG-GAG-TTT-GAC-TCG-T ACT-AGT-TCC-ACC-ATT-TGT-TGT-TC	Este trabajo
Para RT-qPCR			
Fosfatidilinositol 3- cinasa	<i>PvPI3Kq_F</i> <i>PvPI3Kq_R</i>	GGC AGC TGG TGT GAA TGG AGA G CAA CTG AGC TGT CAA TTC AGT CTG G	Este trabajo
Proteína de clasificación vacuolar	<i>PvVps15q_F</i> <i>PvVps15q_R</i>	GCA AGC AAG AGA ATA CTG CCA AGA G GCT ATG CCT CTT CTC TAG CAT CAG G	Este trabajo
Beclina1	<i>PvBeclina1q_F</i> <i>PvBeclina1q_R</i>	CTG CCG CAA TCC TCT CTG CAT C CAC ACT GCT GGC ACC ATG AAC G	Este trabajo
Gen relacionado con autofagia 8	<i>PvAtg8q_F</i> <i>PvAtg8q_R</i>	TCC CTG CTG ACC TGA CTA TTG G TGT AGG AGG AAG GAC GTT GTC C	Este trabajo
Factor de Elongación- 1 α	<i>PvEF1α_q_F</i> <i>PvEF1α_q_R</i>	GGT CAT TGG TCA TGT CGA CTC TGG GCA CCC AGG CAT ACT TGA ATG ACC	Islas <i>et al.</i> , 2011
Nodulina Temprana ENOD40	<i>PvENOD40q_F</i> <i>PvENOD40q_R</i>	AGT TTT GTT GGC AAG CAT CC TAA GCA CAA GCA AAC TGT TG	Blanco <i>et al.</i> , 2009
Transportador de fosfato-4	<i>PvPT-4q_F</i> <i>PvPT-4q_R</i>	GCG GTG ACT AAC ATG TTA GGG CCT GTG CCC TAG TAT TGT TGG	Arthikala <i>et al.</i> , 2013
Para sonda PI3K			
Fosfatidilinositol 3- cinasa	<i>PI3K_F</i> <i>PI3K_R</i>	GAA AGA GCT GAT GAT GAA GA GCA CAG CTT TTT ATA AAT GT	Este trabajo
Para clonación Gateway			
Promotor de Fosfatidilinositol 3- cinasa	<i>PvPI3Kpro_F</i> <i>PvPI3Kpro_R</i>	CAC CAT GTA TGA TAG ATA TGT TAT TGG GAT CAG ATC TTT GGA ACT ACT TCT TTG TAC TG	Cruz, 2014
Fosfatidilinositol 3- cinasa-RNAi	<i>PvPI3K-RNAi_F</i> <i>PvPI3K-RNAi_R</i>	CAC CAG AGC ATC GTA GCA TCAT AAG C CCA TCT GAG GGA ATA ATG CAC TC	Este trabajo
Beclina1-RNAi	<i>PvBeclina1_RNAi_F</i> <i>PvBeclina1_RNAi_R</i>	CAC CAT GCA AGG GTC GTC CGT TCA TG CAA CCT CTT TAT CAA GTT TAT CTG AC	Cruz, 2014 Campos <i>et al.</i> 1997
Factor de transcripción Wrky	<i>Wrky-3_F</i> <i>Wrky-5_R</i>	CTT CTC CAA CCA CAG GAA TTC ATC GCA GAG GAG GAG AAG CTT CTA G	Valdes <i>et al.</i> , 2008

II.6 Biología Molecular

II.6.1 Purificación de plásmido

El plásmido se purificó a partir de una colonia de *E. coli* de interés (pENTR-PI3K-RNAi, proPvPI3K, pENTR-Beclina1, pTDT-Sac-RNAi, pTDT-PvPI3K-RNAi, pTDT-*Beclina1*-RNAi o pBGWFS7,0-proPvPI3K), crecida en 3-5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico de selección por 12 h a 37°C y con agitación (263 $\times g$). Las células se colectaron por centrifugación a 13.684 $\times g$ por 3 min en tubos eppendorff de 1,5 mL. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se utilizó para obtener el plásmido con el kit Gene JET Plasmid Miniprep (Fermentas) de acuerdo al protocolo del fabricante.

II.6.2 Purificación de DNA genómico (modificado del método [Saghai-Marroof et al., 1984](#))

Las hojas jóvenes de *P. vulgaris* se molieron en un mortero con nitrógeno líquido, 1 g del polvo de hoja congelado se colocó en un tubo falcon de 15 mL con 2 mL de la solución de aislamiento de DNA previamente precalentado (a 65°C), se mezcló suavemente por inversión. Se ventiló el tubo periódicamente por el aumento de presión. Se incubó a 65°C por 10 min con inversión ocasional y se centrifugó la muestra por 5 min a 11.263 $\times g$ para separar las fases. Se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorff, se añadió un volumen de isopropanol y se mezcló. El DNA se incubó 5 min en hielo y después se centrifugó a 10.789 $\times g$ por 10 min. La pastilla se disolvió en 400 μL de CsCl 1M y 800 μL de etanol al 96% y se centrifugó a 11.263 $\times g$ por 10 min. La pastilla que se formó se disolvió en 250 μL de amortiguador Tris-EDTA (TE) con RNAsa y 60 μL de NaCl 5M. El DNA se extrajo con un volumen de fenol/cloroformo, la fase acuosa conteniendo el DNA, se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó con un volumen de etanol al 70 %. Después de centrifugar a 11.263 $\times g$ por 10 min, se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se secó brevemente. Se disolvió en 250 μL de TE, se cuantificó en un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y se analizó su integridad mediante una electroforesis en gel.

II.6.3 Extracción de RNA

Todo el material utilizado se esterilizó y se horneó antes de usar. Para la extracción del RNA se utilizó el método de [Chomczynski y Sacchi \(1987\)](#). Brevemente, se colocó 0,1 g del tejido vegetal perfectamente molido en un tubo de 2 mL, se agregó 1 mL de solución D (**Tabla 5**) y se agitó vigorosamente. Se añadió 0,1 mL de acetato de sodio 2 M pH 4,1, 1 mL de fenol ácido (saturado en agua) y 0,2 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), se mezcló por inversión después de la adición de cada reactivo. La suspensión final se agitó por 10 s y se puso en hielo 15 min. Se centrifugó a 10.947 $\times g$ por 20 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo, se mezcló con 1 mL de isopropanol y se incubó a -20°C 1 h para precipitar el RNA. Se centrifugó a 10.526 $\times g$ por 20 min. El precipitado se

disolvió nuevamente en 0,3 mL de solución D y se dejó precipitando con un volumen de isopropanol a -20°C por 1 h. Se centrifugó a 10.526 $\times g$ por 10 min a 4 °C. Se lavó la pastilla de RNA con 1 mL de etanol 75% y se centrifugó a 10.526 $\times g$ 1 min. Finalmente se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante no más de 15 min. Se resuspendió en 20 μ L de agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato). Se cuantificó el RNA y 1 μ g se analizó mediante gel de electroforesis para RNA.

II.6.4 Electroforesis de DNA

El análisis del DNA plasmídico purificado, así como la verificación de fragmentos de DNA obtenidos por medio de PCR, se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo bromuro de etidio (1 μ g/mL) en amortiguador de corrida TAE (Tris 10 mM, EDTA- sal disódica 1 mM, ácido acético glacial 1,2 mM, pH 8). El voltaje aplicado fue de 90 V. Como amortiguador de carga se utilizó glicerol 30% (p/v), azul de xilencianol al 0,25% (p/v) y azul de bromofenol al 0,25% disueltos en agua destilada. Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador 1 Kb (Fermentas, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV 2000 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA) y la imagen fue capturada con una cámara digital Gel Doc 2000 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA) adaptada a una computadora PC con el Programa Quantity one 1D Analysis software (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

II.6.5 RT-PCR *in situ*

Los nódulos fueron colectados y fijados en paraformaldehído al 2,5%, deshidratados en concentraciones crecientes de etanol absoluto en agua al 10%, 30%, 50%, 70%, 90% y 100%, durante 10 min cada vez y embebidos en parafina de acuerdo al método descrito por [Van de Wiel *et al.* \(1990\)](#). El tejido embebido en parafina fue seccionado en cortes de 8 μ m en un Ultramicrotomo Reichert Jung (modelo Ultracut). Cuatro cortes de nódulo se colocaron por cada portaobjeto (Superfrost/Plus, *precleaned*, Fisher Scientific) con ayuda de un pincel de pelo para dejarlos bien adheridos al vidrio, los cuales se colocaron a 42 °C. Los portaobjetos con el tejido se colocaron en una Jarra Tipo Coplin con xylol al 100% por 10 min (se repitió dos veces). Las secciones de los nódulos fueron rehidratados gradualmente en etanol absoluto en agua al 100%, 90%, 70%, 50%, 30% y 10% (durante 10 min cada vez) y con agua DEPC por 5 min. La RT-PCR *in situ* se llevó a cabo de acuerdo al método de [Ruíz-Medrano *et al.* \(1999\)](#). Para esto, los portaobjetos se cubrieron con 25 μ L de la mezcla de transcriptasa reversa: mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2mM), oligonucleótidos *PvPI3K_F-780* y *PvPI3K_R-1646* 1,5 μ M cada uno, 5 μ L de amortiguador EZ de transcriptasa reversa, 0,1 U de Polimerasa *rTth* y acetato de manganeso 2,5 μ M (añadido al final).

La mezcla se preparó inmediatamente antes de usarse, se colocó directamente sobre el tejido y se prensó sobre el portaobjetos con un disco metálico especial (*amplicover*, Perkin Elmer) sellado con pinzas (Applied Biosystems, CA, EUA). La etapa de transcriptasa reversa se llevó a cabo a 60°C por 20 min. Para la etapa de PCR, la mezcla se desplazó por otra en la que se reduce el dTTP (100 µM) y se añadió 20 µM de Cy5-dUTP (*fluorolink*; Amersham, EUA). El protocolo de amplificación se hizo con 10 ciclos: 30 s a 94°C; 30 s a 60°C y 60 s a 72°C. La reacción de amplificación se llevó a cabo colocando los portaobjetos sellados sobre un termociclador acondicionado con un adaptador para RT-PCR *in situ*, PCR UNO II Biometra Whatman Company (Goettingen, Alemania) Después de la amplificación, se removió el clip metálico y el disco. La mezcla de reacción se removió con un papel filtro estéril y a las secciones de nódulos se añadió 1 mL de etanol absoluto por 1 min, se lavaron cinco veces con EDTA 1 mM y se dejaron 12 h a 22°C en esta misma solución protegidos de la luz. Se usó un control negativo tratado en las mismas condiciones sin polimerasa *rTth*. Las secciones de tejidos del RT-PCR *in situ* se analizaron en el microscopio confocal Image System MRC-600 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). La fluorescencia para detectar los transcritos de PI3K amplificados y marcados con Cy5 se hizo con un láser Kr/Ar y las combinaciones de filtros apropiados. Las imágenes de contraste de fase se captaron en la computadora y fueron procesadas en Adobe Photoshop 7,0. Estos ensayos se hicieron por duplicado de experimentos donde se usaron 3-4 secciones de tejido para cada muestra.

II.6.6 RT-PCR semicuantitativo

La extracción de RNA de diferentes tejidos (nódulo, hoja, flor, raíz y tallo) de *P. vulgaris* se llevó a cabo con tiocianato de guanidina ([Chomczynski y Sacchi, 1987](#)). Para analizar la expresión de genes de los tejidos, se llevó a cabo una reacción de RT-PCR en dos etapas: la síntesis de cDNA seguida por las reacciones de PCR. El cDNA se sintetizó usando M-MLVRT y oligo dT₂₅-VN de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se hicieron con 2 µL de cDNA, 0,5 U de *Taq* Polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA), amortiguador 10X, dNTPs 0,2 mM y 0,1 µM de cada oligo. Para amplificar el gen *PI3K* se usaron los oligos *PvPI3K_F* y *PvPI3K_R*; para el gen constitutivo Aquaporina, se usaron los oligos *PvAq_F* y *PvAq_R* ([Campos et al., 1997](#)) y un control negativo sin molde. Las condiciones de la reacción fueron: 60 s a 94°C; 30 ciclos de 60 s a 94°C, 60 s a 56°C y 45 s a 72°C en un termociclador DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, EUA). Los productos de PCR se detectaron en geles de agarosa.

II.6.7 Cuantificación de los niveles de transcrito por análisis de transcripción reversa cuantitativa (PCR cuantitativa)

El RNA total fue extraído de los tejidos molidos y congelados usando TRIzol (LifeTechnologies, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) según las instrucciones del fabricante, después se analizó su integridad por medio de una electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó en un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, MA, EUA).

La RT-qPCR se realizó en dos etapas usando el kit de síntesis de cDNA Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit para RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) y el kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.6.7.1 Síntesis de cDNA

Para eliminar el DNA genómico, las muestras de RNA total (1 µg en 10 µL) fueron tratadas con 1 µL de DNAsal, libre de RNasa (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, EUA) a 37°C por 30 min, la cual se inactivó a 65°C por 10 min. Se adicionaron 2 µL de oligonucleótido dT₁₈ (0,25 µg/µL) y se incubaron 5 min a 65°C, después se añadió a cada tubo 8 µL de una mezcla con 4 µL de amortiguador de reacción 5x, 2µL de inhibidor de RNasa (RiboLock), 1 µL de la mezcla de dNTPs 10 mM y 1 µL de transcriptasa reversa para tener un volumen final de 20 µL; se incubó por 1 h a 42 °C y posteriormente se transfirieron los tubos a 65 °C por 10 min.

II.6.7.2 Reacción de qPCR

Cada reacción fue preparada usando 10 ng de RNA como molde en un volumen final de 20 µL. Los oligonucleótidos específicos para cada gen usados en las reacciones de RT-qPCR están listados en la **Tabla 6**. Las qPCRs se realizaron en el termociclador LightCycler480 (Roche, Penzberg, Alemania) en las siguientes condiciones: una preincubación de 95 °C, 10 seg; 40 ciclos a 95°C 10s, 60°C 10 s y 72°C 10 s; y un enfriamiento a 37°C 30s. La abundancia relativa de los transcritos fue expresada como $2^{-\Delta CT}$ o $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde $\Delta CT = (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen de referencia})$ y $\Delta\Delta CT = [(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen de referencia}) \text{ muestra A}] - [(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen de referencia}) \text{ muestra B}]$ (Schmittgen y Livak, 2008).

El factor de elongación 1α (PvEF1α) se usó como gen de referencia, como describieron previamente Islas *et al.* (2011) y Montiel *et al.* (2012). Los datos mostrados en las gráficas de RT-qPCR son los promedios de tres o cuatro experimentos independientes o réplicas biológicas y cada muestra se evaluó por triplicado dentro de cada experimento.

II.6.8 PCR de colonia

Para llevar a cabo la PCR a partir de clones bacterianos, se analizaron 10 colonias de cada transformación. Cada colonia se sembró en 3 mL de LB con el antibiótico de selección y se incubaron a 37°C (*E. coli*) o a 30°C (*Agrobacterium*) durante toda la noche. El cultivo se transfirió a un tubo eppendorff y se centrifugó a 10.526 $\times g$ por 3 min. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 100 μ L de agua destilada. Los tubos se congelaron a -80 °C durante 10 min e inmediatamente después se hirvieron por 10 min, se repitió este procedimiento de congelamiento y ebullición tres veces seguidas. Se centrifugaron los restos bacterianos con un pulso de 13.600 $\times g$ y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se tomaron 1 a 2 μ l del sobrenadante como templado para llevar a cabo la PCR.

II.7 Estudios Bioinformáticos

II.7.1 Análisis filogenético

La búsqueda de secuencias de aminoácidos de las proteínas PI3K clase III se hizo en las bases de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>), Phytozome c11 (<http://www.phytozome.net>) y PLAZA (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>; Proost *et al.*, 2009) (Tabla 7).

El alineamiento de secuencias múltiples se realizó usando el algoritmo ClustalW (Anexo 1) y el árbol filogenético fue generado usando el método “neighbor-joining” con 1000 ensayos de rutina (*bootstrap trials*). Ambos procedimientos se implementaron en el programa MEGA 5 (Thompson *et al.*, 1997). El árbol filogenético fue generado usando el programa MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>; Tamura *et al.*, 2011).

II.7.2 Números de acceso del Banco de genes

Tabla 7. Proteínas PI3K clase III utilizadas para el alineamiento y el árbol filogenético

Especie	No. acceso	Identidad %	Similitud %
<i>Glycine max</i> isoforma de raíz	NP_001236955.1	95,1	97
<i>Glycine max</i> isoforma de nódulo	XP_003526545.1	94,7	96,9
<i>Phaseolus vulgaris</i>	ABA03136.1	-	-
<i>Medicago truncatula</i>	CAD56881.1	93,5	95,8
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002318628.1	88	92,8
<i>Vitis vinifera</i>	XP_002267769.2	89,1	93,5
<i>Nicotiana tabacum</i>	AAW80628.1	86,7	92,1
<i>Solanum lycopersicum</i>	XP_004236633.1	86,5	92,5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEE33693.1; At1G60490.1	83,4	90,7
<i>Brassica napus</i>	AAN62481.1	82,4	89,7
<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001762959.1	74,8	85,7
<i>Zea mays</i>	AFW62054.1	76,4	86,8
<i>Hordeum vulgare</i>	BAJ91813.1; AK360604.1	75	86
<i>Triticum urartu</i>	EMS55477	71,2	81,3
<i>Oryza sativa japonica 2</i>	NP_001054810.1	74,6	85,2
<i>Oryza sativa japonica 1</i>	NP_001061506.1	62,7	75,1
<i>Amborella trichopoda</i>	ERN10666.1	78,9	86,9
<i>Micromonas sp.</i>	XP_002506109.1	49,5	64,4
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001689631.1	34,4	45,4
<i>Dictyostelium discoideum</i>	AAA85726.1	41,6	60,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EDV08569.1	35,8	52,2
<i>Candida albicans</i>	Q92213	31,6	48
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	AAC49133.1	40	55,9
<i>Trametes versicolor</i>	EIW57772.1	43,4	59,6
<i>Talaromyces marneffeii</i>	XP_002147483.1	40,5	57,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	XP_001824747.1	41	58,1
<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001824747.1	39,9	58
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_477133.1	37,2	53,4
<i>Homo sapiens</i>	NP_002638.2	42	59
<i>Mus musculus</i>	AAH24675.1	38,9	55,3

%, porcentaje de identidad y similitud con PI3K de *P. vulgaris*

II.7.3 Obtención del clon de PI3K de *Phaseolus vulgaris*

El clon completo de cDNA de *PvPI3K* se obtuvo a partir de una librería λ ZAP (Stratagene, CA, EUA) utilizando la sonda homóloga de 847 pb (arriba descrita) marcada radioactivamente al azar (*random priming*) en presencia de [α - 32 P] dCTP para el tamizado. La librería se hizo a partir de nódulos de 20 días post infección (dpi) de acuerdo al instructivo de Stratagene (Stratagene, CA, EUA). Las placas de fago se extendieron en una caja de Petri (15 cm de diámetro) a una densidad de aproximadamente 50.000 placas por caja. Los filtros de nitrocelulosa impregnados con las placas se hibridaron a 65°C por 18 h con la sonda marcada y desnaturalizada en amortiguador de hibridación [NaHPO₄ 0,5 M pH 7,2, SDS 7% (w/v), BSA 1%, EDTA 1mM]. Los filtros se lavaron en amortiguador de fosfatos (NaHPO₄ 40 mM pH7,2, SDS 5% (w/v), EDTA 1 mM) con agitación, a temperatura ambiente por 15 min y dos veces a 65°C por 15 min. Los filtros húmedos se expusieron en una hoja radiográfica toda la noche a -70°C. Después de hacer el revelado de la hoja, se encontró un clon positivo, el cual se purificó y el inserto de cDNA se recuperó del fago recombinante por coinfección con un fago *helper Exassist* (Stratagene, CA, EUA). El plásmido Bluescript resultante contenía el inserto de cDNA (2,7 kb) y el análisis de secuencia confirmó que correspondía a la región codificante de *PvPI3K*.

II.8 Construcción de vectores

II.8.1 Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

Para obtener los fragmentos de la región de interés de cada construcción, se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la **Tabla 6** con la Polimerasa DNA *Pfu* (Fermentas Thermofisher Scientific, MA, EUA), con el objeto de generar extremos romos. La reacción de PCR consistió en una etapa de desnaturalización de 3 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de: a) desnaturalización a 95°C, 30 s; b) alineamiento de los oligonucleótidos a 60°C durante 30 s y c) extensión a 72°C por tiempos variables de 30 a 60 s (dependiendo de la longitud del fragmento, 1 min/kb) y finalmente una etapa de extensión a 72°C por 7 min. La mezcla de reacción consistió del DNA molde (15-25 ng), solución amortiguadora para PCR, MgSO₄ 1,5 mM, dNTPs a una concentración final de 0,2 mM de cada uno, oligonucleótidos sentido 0,2 mM y antisentido 0,2 mM, Taq *Pfu* polimerasa recombinante 0,5 U/ μ L y agua destilada por filtro milliQ (Millipore) a una volumen final de 25 μ L.

II.8.2 Clonación de productos de PCR en el vector pENTR/D-TOPO

Se utilizó el vector de clonación direccional pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen Thermofisher Scientific, MA, EUA). Para obtener la clonación unidireccional del fragmento deseado se

diseñaron oligonucleótidos sentido (5'-3') con cuatro pares de bases (CACC) adicionales en el extremo 5'. Fue necesario utilizar la Polimerasa *Pfu* que deja extremos romos en los extremos del producto de PCR. El vector contiene una topoisomerasa que permite la ligación del fragmento a la secuencia complementaria GTGG que sobresale en uno de los extremos del vector. La reacción de ligación del producto de PCR con respecto al vector se llevó a cabo usando una relación molar de 0,5-2:1, producto de PCR: vector. El protocolo consistió en mezclar el producto de PCR con el vector y se incubó a 25°C durante 12 h.

II.8.3 Transformación de células electro-competentes de *E. coli*

Se descongelaron alícuotas de 50 µL de células *E. coli* electro-competentes en hielo por 15-20 min. Se añadieron 50-100 ng de la reacción de la ligación o de la reacción de recombinación. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, las células se colocan en una cubeta de electroporación de 0,1 cm (Bio Rad, Hercules, CA, EUA), la cual se colocó en un sistema de pulso eléctrico (Gene pulser® system, Bio Rad) y se sometieron a un choque eléctrico de 1,66 V (25 µFD) por 5 ms, inmediatamente después se añadieron 250 µL de medio S.O.C. para la recuperación de las células y se incubaron durante 1 h a 37°C. El cultivo se plaqueó en una caja de Petri con LB sólido suplementado con el antibiótico de selección y se incubaron a 12-16 h a 37°C.

II.8.4 Reacción de recombinación con el vector binario

Una vez que se verificó por secuenciación o por PCR que el fragmento deseado estaba clonado correctamente en el vector de entrada (pENTR™ Directional TOPO®, Invitrogen), se llevó a cabo la reacción de recombinación de 50 ng del clon de entrada con 150 ng del vector de destino. Para esto, se utilizó 2 µL de la enzima LR clonasa (Invitrogen Thermofisher Scientific MA, EUA) con amortiguador TE pH 8,0 (Tris-HC 10 mM, EDTA 1 mM) en un volumen final de 10 µL. La reacción de recombinación se incubó durante 12 h a 25°C, después se trató con 1 µL de proteinasa K (2 µg/µL) por 10 minutos a 37°C. La proteinasa K degrada la LR clonasa y detiene el proceso de recombinación. Para transformar genéticamente las células de *E. coli* DH5α por electroporación se usaron 2 µL de la reacción de recombinación. Las colonias que resultaron de la transformación fueron seleccionadas mediante PCR de colonia para verificar la clonación del gen de interés. A continuación se llevó a cabo la purificación del plásmido del clon positivo en las condiciones antes descritas. Luego se mandó a secuenciar a la Unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México). Para esto, en tubos de 0,2 mL se mezclaron 700 ng de DNA con 10 pmoles de oligo M13F o M13R en un volumen final de 16 µL. De esta forma se generó la construcción *PvPI3K-RNAi*.

Para generar la construcción del promotor *proPvPI3K:GFP-GUS*, un fragmento de 1,050 pb ubicado corriente arriba del codón de inicio de *PvPI3K* fue amplificado por PCR usando el DNA genómico de *P. vulgaris* como molde con los oligonucleótidos *PvPI3Kpro_F* y *PvPI3Kpro_R* (**Tabla 6**). El producto de PCR fue clonado en el vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen Thermofisher, MA, EUA). Su secuencia se confirmó por secuenciación y fue recombinado en el vector binario destino pBGWFS7,0 (Karimi *et al.*, 2002) usando el sistema Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen Thermofisher, MA, EUA). Este plásmido es producto del trabajo de tesis de Cruz, 2011.

La construcción *PvBeclina1-RNAi* fue generada a partir del fragmento de 400 pb del extremo 5' (*Untranslated Region*, UTR) de *PvBeclina1* amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos *PvBeclina1-RNAi_F* y *PvBeclina1_RNAi_R* (**Tabla 6**). El producto de PCR fue clonado en el vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen Thermofisher Scientific, MA, EUA). Se confirmó por secuenciación y se recombinó en el vector binario pTDT-DC-RNAi para obtener el vector pTDT-Beclina1-RNAi. Este plásmido es producto del trabajo de tesis de Cruz, 2014).

Para la construcción del *PvPI3K-RNAi*, un fragmento de 537 pb correspondiente a la región 3' de la secuencia codificante de *PvPI3K* fue amplificada por PCR usando los oligonucleótidos *PvPI3K-RNAi_F* y *PvPI3K-RNAi_R* (**Tabla 6**) con el cDNA de nódulos de *P. vulgaris* (20 dpi). Después de clonar este fragmento en pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen Thermofisher Scientific, MA, EUA) y confirmar la presencia y orientación del inserto por secuenciación, el producto de PCR fue recombinado en sitios compatibles del vector pTDT-DC-RNAi, el cual contiene un tallo asa, basado en el sistema de clonación/recombinación Gateway (Valdes-Lopez *et al.*, 2008). La orientación correcta de los fragmentos recombinados fue confirmada por secuenciación y por PCR usando los oligonucleótidos *Wrky-3_F* o *Wrky-5_R* con *PvPI3K-RNAi_F* (**Tabla 6**), como describió Valdes-Lopez *et al.*, (2008).

El vector (pTDT-*PvPI3K-RNAi*) resultante dirige la transcripción de un tallo asa *PvPI3K-RNAi* bajo el control del promotor 35S. Adicionalmente, el vector contiene el *cassette NOSprom:tdT*, el cual media la expresión del marcador fluorescente *tdTomato* (Shaner *et al.*, 2004) y permite la identificación de las raíces transformadas.

La secuencia del dominio FYVE utilizado en este trabajo proviene de dicho dominio presente en la proteína Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*). Para sobre expresar el dominio FYVE se usó el plásmido pGreen35S:YFP-2xFYVE, amablemente donado por el Profesor Teun Munnik (Section of Plant Physiology, Swammerdam Institute for Life Sciences, Universidad de Amsterdam, Holanda) (Vermeer

et al., 2006). Todos los plásmidos binarios construidos fueron introducidos por electroporación en la cepa *A. rhizogenes* K599.

II.8.5 Preparación de células electro-competentes de *A. rhizogenes*

Las células de *A. rhizogenes* se cultivaron durante 16 h en un tubo de ensayo con 5 mL de LB a 30°C en constante agitación (250 rpm). Al término, se utilizó 1 mL como inóculo de 100 mL de LB. El cultivo se incubó a 30°C con agitación constante (225 rpm) hasta que alcanzó una OD_{600nm} de 0,5. En este punto se detuvo el crecimiento y se centrifugaron las células a 5.000 × *g* durante 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron 3 veces las células con agua desionizada estéril. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 mL de glicerol al 20%. Las células se distribuyeron en alícuotas de 50 µL en tubos eppendorff estériles. Las células se almacenaron a -80°C hasta su uso. Todos los reactivos y el material de este protocolo se pre-enfriaron a 4°C y las células desde que se cosecharon se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento.

II.9 Generación de plantas compuestas de *P. vulgaris*

II.9.1 Desinfección y germinación de semillas

En este estudio se utilizó *P. vulgaris* L. cv. Negro Jamapa. Se seleccionaron aproximadamente 100 semillas de *P. vulgaris* de la mejor calidad y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. En condiciones estériles, se lavaron con 100 mL de agua estéril cuatro veces con agitación. La superficie de las semillas de *P. vulgaris* se esterilizó por tratamiento con etanol 96 % durante 1 min y se lavaron con agua estéril cuatro veces, posteriormente se añadió hipoclorito de sodio al 20 % durante 5 min con agitación suave. Después se realizaron cuatro lavados sucesivos con agua estéril y se colocaron en recipientes metálicos con toallas de papel húmedas con una separación de aproximadamente 2 cm entre cada semilla (**Figura 12**). Se cubrió el recipiente con papel aluminio, se colocó ligeramente inclinado y se incubaron en la obscuridad por 2 días a 25-28°C en una cámara de germinación. Posteriormente, los germinados de *P. vulgaris*, se transfirieron a vasos con vermiculita o en caso de proceder a la generación de plantas compuestas, se infectaron con *A. rhizogenes* y se colocaron en tubos de vidrio (20 cm x 2,2 cm de diámetro) conteniendo solución nutritiva B&D. Una vez que emergieron las raíces pilosas se eliminó la raíz principal y las plantas se transfirieron a macetas o a vasos plásticos con el sustrato requerido (vermiculita grado 3 para nodulación o metromix para micorrización) suplementados con el medio B&D (solución de nutritiva para leguminosas) (**Figura 12**).

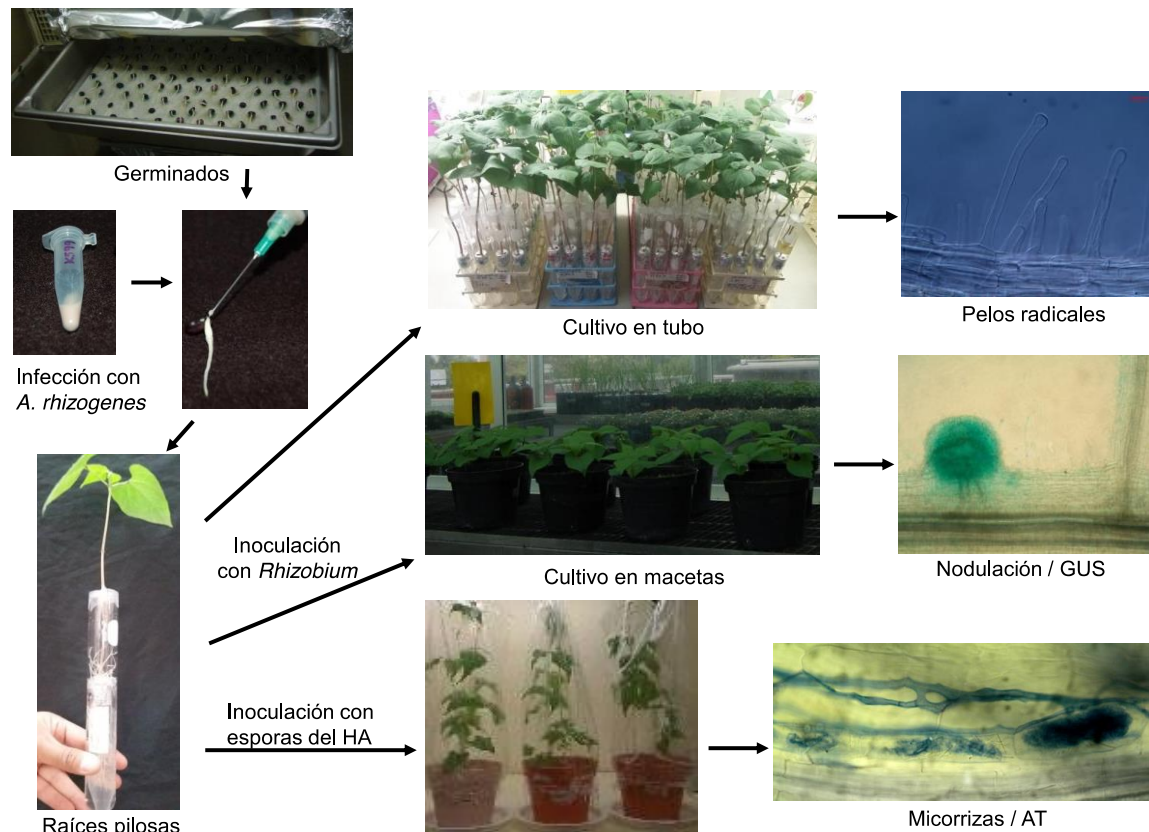


Figura 12. Esquema del procedimiento de generación de plantas compuestas de poroto.

Las raíces pilosas se obtuvieron a partir de germinados de dos días infectados con *A. rhizogenes* K599 con el transgen de interés. Se colocaron en un tubo con solución nutritiva B&D y aproximadamente doce días después, se observaron las raíces pilosas. Después de este tiempo, un grupo de plantas se colectaron o se cultivaron en tubo para análisis de pelos radicales. A otro grupo de plantas, se les eliminó la raíz principal para transferirlas a macetas e inocularlas con *Rhizobium* o con esporas del hongo *R. irregularis*. Después del riego y cuidado adecuado de las plantas, se colectaron los tejidos para ensayos de histoquímica (con glucuronidasa, GUS), tinción (AT, azul de tripano) o para ensayos de PCR (ver detalles en el texto).

II.9.2 Preparación del inóculo e infección de las plántulas

Las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* K599 se sembraron directo del *stock* en glicerol (aprox. 250 μ L /caja) en las cajas de Petri con medio LB con la adición de los antibióticos respectivos del plásmido de selección. Después de 48 h de incubación a 30°C, se colectó el cultivo de la caja de Petri y se resuspendió en aproximadamente 250 μ L de solución B&D estéril en tubos eppendorff de 1,5 mL. Con esta suspensión se inyectaron plantas de dos días desde la germinación directamente en la región del epicotilo. Las plántulas se inocularon con una jeringa de 2 mL (aguja 21Gx32 mm; 0,8 mm, 1 $\frac{1}{4}$ "') procurando que la punta de la jeringa alcance el tejido vascular y se liberaran 1 a 2 gotas del inóculo en la

herida. Los protos se colocaron sobre un soporte de plástico (tubo falcon de 15 mL) de tal forma que la herida quedara encima del nivel de la solución y la raíz sumergida. Los tubos de vidrio se cerraron con una tapa de plástico para conservar la humedad. Después de la infección se procedió al cuidado y riego cada tres días con el medio B&D. Conforme crecían las plantas el tapón se cambió por *parafilm* o *ega-pack*, lo que les permitió crecer fuera del tubo. Una semana después de la inoculación, las plantas infectadas con las cepas de interés empezaron a mostrar ápices de raíz que crecían desde los sitios de la herida.

II.9.3 Obtención de raíces pilosas de *P. vulgaris*

Usualmente a la segunda semana de la infección con *A. rhizogenes* K599, se observaron las raíces pilosas (aproximadamente de 3 cm de largo) emerger del callo. El método de transformación que se llevó a cabo es de acuerdo al descrito por Estrada-Navarrete *et al.*, (2007), con las modificaciones de procedimientos aquí descritas. En los tiempos indicados en los experimentos, las raíces pilosas fueron observadas bajo el estereoscopio de epifluorescencia (Olympus SZX7) y las raíces transgénicas fueron seleccionadas con base a la expresión de la proteína roja fluorescente *tdTomato* (*tandem dimer Tomato*; Shaner *et al.*, 2004) codificada por la construcción derivada del vector pTDT-DC-RNAi. Las raíces peludas no fluorescentes fueron escindidas con un bisturí desde el sitio de emergencia y descartadas. Las raíces pilosas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C o sujetas a análisis fenotípico.

II.10 Cuantificación de pelos radicales

Las raíces transgénicas se aclararon y se montaron en una solución que contenía NaI 4,2 M y Na₂S₂O₃ en glicerol al 65% y dimetilsulfóxido al 2% como describe Dubrovsky *et al.*, 2009. Las raíces se cortaron en secciones de aproximadamente tres centímetros de longitud y se montaron en un portaobjetos. El número de pelos radicales con una longitud mayor y menor a 130 μm se cuantificó por milímetro, con base a imágenes capturadas por campo microscópico. Se utilizó un microscopio Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con óptica Nomarski, acoplado a una cámara a color Photometrics CoolSNAPcf (Valley International Corporation, TX, EUA), con un lente NA40 X/1 con un objetivo de inmersión en agua.

II.10.1 Aislamiento de pelos radicales y puntas de las raíces

Los pelos radicales se aislaron de acuerdo al protocolo del laboratorio de Gary Stacey (Root Hair Systems Biology website, University of Missouri-Columbia, MO, USA (<http://www.soyroothair.org/index.php/education/4-research/protocols/12-root-hair-isolation-protocol>)). Brevemente, las plántulas de *P. vulgaris* (48 h post-germinación) se sujetaron con pinzas y las puntas de las raíces (aproximadamente 0,5 mm) se cortaron con

tijeras. Por medio de un segundo corte en la base de la raíz se liberó el segmento restante de la raíz. Las puntas de las raíces y segmentos de raíces recién colectados se colocaron en vasos de precipitado separados, se sumergieron en nitrógeno líquido y se agitaron vigorosamente para separar los pelos radicales de las raíces. Los pelos radicales fueron aislados vertiendo la mezcla de nitrógeno líquido a través de un colador de metal. Las puntas de las raíces y las raíces peladas o rasuradas (las cuales quedaron retenidas en la coladera) y los pelos radicales se colectaron después de la evaporación de nitrógeno y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

II.11 Ensayos de nodulación de plantas de *P. vulgaris*

La bacteria *Rhizobium tropici* CIAT899 se creció en matraces de 250 mL con 100 mL de PY suplementado con CaCl_2 7mM, rifampicina $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ y ácido nalidíxico $20 \mu\text{g ml}^{-1}$, en agitación constante (250 rpm) a 30°C hasta que la suspensión alcanzó una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 0,8. Para los ensayos de nodulación, las plantas transgénicas fueron trasplantadas a macetas (10 × 10 cm) con vermiculita, inoculadas con 1 mL de suspensión de *R. tropici* CIAT899 diluido a una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 0,05 en MgSO_4 10 mM y crecidas en un cuarto de crecimiento con ambiente controlado (16 h luz / 8 h oscuridad, a 26°C). Las plantas fueron regadas (hidratadas) de tres a cuatro veces por semana con solución B&D con KNO_3 2 mM. A los tiempos post inoculación indicados, las raíces transgénicas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C o analizadas para detectar fenotipo. Las plantas con déficit de nitrógeno crecieron con solución B&D que contiene KNO_3 0-2mM, mientras que las plantas con B&D con KNO_3 8-10 mM se consideraron sin déficit de nitrógeno.

II.12 Análisis de la actividad fotosintética de las plantas compuestas de *P. vulgaris*.

Las hojas de las plantas compuestas de *P. vulgaris* de 15-20 días post-inoculación (dpi) con *R. tropici* CIAT899, fueron utilizadas para medir la eficiencia fotosintética de acuerdo al protocolo desarrollado por el Dr. Reto J. Strasser y su equipo en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Génova, Suiza (<http://www.retostrasser.ch/>). Las plantas se colocaron en una cámara oscura durante 30-60 min, después de ese tiempo se tomaron 3 lecturas de la parte adaxial de cada hoja con una pequeña pinza circular adaptada a un instrumento detector (Handy PEA V 1.3). Se hicieron lecturas de 2 trifolios de 3 plantas de cada condición dejando las plantas intactas. Las lecturas registradas se procesaron con el programa de actividad fotosintética y los valores obtenidos se graficaron.

II.13 Inoculación con esporas de *Rhizophagus irregularis* y micorrización

Las plantas silvestres (de 2 d) o las plantas compuestas de poroto (de 5 d, *PvPI3K-RNAi* y control) se transfirieron a macetas (20 cm de diámetro) con Metromix estéril, se inocularon con 800 esporas de *R. irregularis* por planta que fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Ignacio M. Mendoza, Instituto Politécnico Nacional, México. Las plantas inoculadas fueron irrigadas dos veces por semana con solución de B&D 0,5X que contenía una baja concentración de fosfato de potasio (10 μ M) para favorecer la colonización del hongo arbuscular (Smith *et al.*, 2003).

II.14 Tinción de Micorrizas

Las raíces infectadas fueron colectadas de las plantas a 21 y 42 dpi y se tiñeron de acuerdo con un procedimiento de tinción modificado por Koske y Gemma, 1989. Para ello, las raíces transgénicas se lavaron con agua de red esterilizada en autoclave para remover el metromix remanente utilizado como sustrato. Después se seleccionaron las raíces con fluorescencia (del gene reportero *tdT*) y se cortaron en segmentos de 2-3 cm de largo desde la punta. Los pedacitos de raíz se colocaron en un tubo Falcon con tapa. Se añadió una solución fijadora (50 mL de etanol, 5 mL de ácido acético, 10 mL de formaldehido y 35 mL de agua) suficiente para cubrirlas bien, más un volumen adicional y se dejaron toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, los pedazos de raíz se enjuagaron varias veces con agua destilada para remover la solución fijadora. Después se añadió una solución de aclaración con KOH al 2,5 % y se hirvieron a 90 °C en un *termoblock* por 10-30 min. Para remover la solución de KOH de las raíces, se lavaron con agua destilada 5 a 7 veces. Para decolorar las raíces se utilizó una solución de H₂O₂ alcalina preparada al momento de usarla (3 mL de NH₄OH al 20% w/v + 27 mL de H₂O₂ al 3%), en cantidad suficiente para cubrir las muestras y se dejó la solución durante 10-45 min. Se removió la solución de H₂O₂ alcalina y se lavaron con agua 5 a 7 veces. Después se llevó a cabo una acidificación con HCl 1% v/v con agitación durante 1-2 h (se pueden dejar hasta 8-10 h). Después se removió el HCl y se lavaron con agua destilada una vez. Las muestras acidificadas se tiñeron con azul de tripano al 0,05-0,4% en solución de glicerol ácido (500 mL de glicerol + 450 mL de HCl 1% v/v) y se calentaron 15-30 min a 90°C (o por 1 hora o 60-80°C en un horno) (Koske y Gemma, 1989).

Para remover el colorante de las raíces se añadió una solución de glicerol-ácido y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente. Para observar las muestras en el microscopio se montaron en un portaobjetos en glicerol al 50 %/PBS 1X.

Preparación de colorantes

Azul de tripano (*Trypan Blue*, Sigma Aldrich, MO, EUA). Se disolvieron 625 µL de solución de azul de tripano al 0,4% en 100 mL de agua MiliQ.

La Aglutinina de germen de trigo (AGT) conjugada con Alexa Fluor633 (AGT-Alexa Fluor 633, Molecular Probes, Invitrogen), se preparó como describió [Javot et al., \(2007\)](#).

El estado de colonización de las raíces por los hongos arbusculares fue determinado por microscopía luminosa y confocal, según se indica en la sección de microscopía.

II.15 Cuantificación de la colonización micorrícica

La determinación de la colonización micorrícica de la raíz se realizó en raíces colectadas de las plantas experimentales crecidas bajo las condiciones mencionadas arriba. Esta medida estima el crecimiento del hongo arbuscular por el método de intersección de cuadrante ([Giovannetti y Mosse, 1980](#)) que se usa comúnmente para medir la longitud de la raíz y el porcentaje de la colonización micorrícica.

En una caja de Petri cuadrículada en la base con cuadros 1,1 X 1,1 cm, se extendieron las raíces teñidas. Bajo el microscopio se exploraron las líneas horizontales y verticales de la cuadrícula. Se registró el número total de raíces que interceptaron las líneas de la cuadrícula, las cuales representan: la longitud total de la raíz en cm, el total de la longitud de la raíz micorrizada y el número de intersecciones con estructuras micorrícicas. Se calculó el porcentaje de colonización por longitud de raíz (%RLC) utilizando la siguiente fórmula:

$$\%RLC = N_{irm} / N_{rt} \times 100$$

N_{irm} = Número total de intersecciones con raíces micorrizadas.

N_{rt} = Número total de raíces.

Estos datos se utilizaron para determinar las longitudes tanto de raíz completa como de la raíz micorrizada. El porcentaje de colonización micorrizada de la raíz (% RLC) se calculó incluyendo todas las estructuras fúngicas ([McGonigle et al., 1990](#)).

II.16 Ensayo de reducción de acetileno

La fijación de nitrógeno se evaluó usando el método de reducción del acetileno ([Vessey, 1994](#)). Las raíces transgénicas noduladas de 20 dpi (seis raíces individuales por experimento) se colocaron en un vial de 160 mL sellado con un tapón de plástico. 2 mL de aire fueron aspirados con una jeringa del vial cerrado, inmediatamente, se remplazaron con un volumen igual de gas acetileno. Después de que las muestras fueron incubadas por

60 min a temperatura ambiente, se evaluó la producción de etileno por medio de cromatografía de gas en un cromatógrafo Varan 330. Inmediatamente después de la cromatografía, los nódulos se separaron de las raíces, se dejaron secar a 60°C durante dos días y se pesaron. La actividad específica de la nitrogenasa se expresó como mmol de etileno $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso seco de nódulo.

II.17 Análisis microscópico y de imágenes

Los hilos de infección y los nódulos seccionados se analizaron en raíces transgénicas colectadas a los 12-17 dpi bajo un microscopio confocal Zeiss LSM 510. Las raíces transgénicas portadoras de la construcción *proPvPI3K:GFP-GUS* se analizaron por análisis histoquímico con base a la actividad de GUS, según se describió previamente (Jefferson *et al.*, 1987). Adicionalmente, las raíces transgénicas se observaron bajo el microscopio Zeiss Axioscop con lentes 10×, 20× y 63×, o por microscopia confocal en el microscopio Zeiss LSM 510 Meta del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA-IBT, UNAM). La proteína fluorescente GFP fue excitada con un láser de ion argón/2 (488 nm), la fluorescencia emitida fue colectada por medio del filtro de IR BP-500-530 nm. Para observar la fluorescencia de tDT y DsRed, las muestras se excitaron a 543 nm y la emisión fue captada con el filtro LP 560. La aglutinina de germen de trigo fluorescente (AGT-Alexa Fluor 633, canal rojo) fue excitada por el láser He Ne2 a 633 nm y la fluorescencia emitida fue colectada usando el filtro BP507-IR.

II.18. Microscopía óptica de nódulos embebidos en resina LR-White

Nódulos de 20 dpi (cuatro a seis nódulos fueron colectados de diferentes plantas compuestas) se fijaron en p-formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,4% en solución amortiguadora de PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Después se sometieron a una deshidratación gradual en etanol absoluto (de 10 a 100 %) y se incluyeron en resina *LR-White*. Para analizar los nódulos por microscopía óptica, los nódulos se cortaron en un ultra micrótopo (Leica Ultracut R, Viena, Austria) en secciones semifinas de 7 μm . Las secciones se fijaron en un portaobjetos de vidrio y se trataron con una serie decreciente de concentraciones de etanol. Las muestras se tiñeron con 0,1% (p / v) de solución de azul de toluidina por 40 min seguido de un lavado con agua destilada. El análisis de los tejidos se hizo en un microscopio de luz Motic BA300 (Xiamen, China) y fotografiado con una cámara digital Motic M1000 (Xiamen, China).

II.19 Análisis estadístico

Para validar cuantitativamente los resultados obtenidos se llevaron a cabo al menos dos réplicas biológicas de cada experimento (n). En cada réplica se analizó un determinado número de muestras, de las cuales se sacó un promedio por cada grupo. Este número fue diferente para cada experimento y se menciona en las gráficas. En el caso del RT-qPCR se consideró el promedio de las lecturas registradas por triplicado por cada muestra (réplica técnica). El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows. La prueba *t*-Student no pareada de dos colas se usó para determinar si los datos de dos grupos diferentes fueron estadísticamente significativos y la prueba de ANOVA de una vía se usó para las comparaciones múltiples.

En las gráficas se indica por medio de uno, dos o tres asteriscos, las diferencias que son estadísticamente significativas con $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, respectivamente.

CAPITULO III
CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA DEL GEN PI3K
Y CONSTRUCCIONES

III.1 Aislamiento del clon de cDNA de PI3K

Al inicio de este proyecto no teníamos disponibles en internet bancos de genes de poroto para el estudio de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K), por lo que se usaron dos bancos: uno genómico y uno de cDNA de *P. vulgaris*, elaborados por el Dr. Rodolfo López Gómez (Profesor de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México). Para aislar el clon de PI3K de cada banco, se utilizó una sonda homóloga generada a partir de RNA (método de purificación de [Chomczynski y Sacchi, 1987](#)) de nódulos de poroto de 20 días post inoculación (dpi) (**Figura 13**). La sonda se sintetizó por PCR utilizando los oligonucleótidos PI3K_F y PI3K_R (**Tabla 6**) diseñados a partir de las secuencias de DNA (*GmPI3K1* y *GmPI3K5*) de soja ([Hong y Verma, 1994](#)). El producto de la reacción de PCR produjo un fragmento de 847 pb que se usó como sonda marcada para tamizar los bancos de *P. vulgaris* (**Figura 13 B**).

Después de tres rondas sucesivas de hibridación (sobre filtros de nitrocelulosa) entre la sonda purificada y marcada radioactivamente con los clones (50.000) del banco de cDNA lambda Zap (y de tres lavados estrictos como se describe en **II.7.3**), se seleccionaron los clones que resultaron positivos. Después de transferirlos al plásmido pBluescript (pBS), se seleccionaron únicamente trece clones, de 300 clones analizadas, los cuales dieron una señal positiva radioactiva por duplicado (**Figura 13 A**). De los clones positivos se llevó a cabo una purificación de plásmido con una mini preparación de DNA. Los clones digeridos con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* liberaron fragmentos de tamaños diferentes. Se seleccionó el clon 1, de mayor tamaño, para asegurar que estuviera completa la secuencia del cDNA (**Figura 13 C**). El clon pBS-PI3K se mandó secuenciar y el análisis por BLASTX mostró que la secuencia de 2.694 pb contiene un marco abierto de lectura de 2.436 pb que corresponde a la PI3K. Después se hizo una digestión sencilla y una doble en sitios únicos del plásmido para liberar un fragmento del tamaño esperado (**Figura 13 D**). La secuencia fue reportada como *PvPI3K* en la base de datos del banco de genes con el número de acceso DQ118425.1.

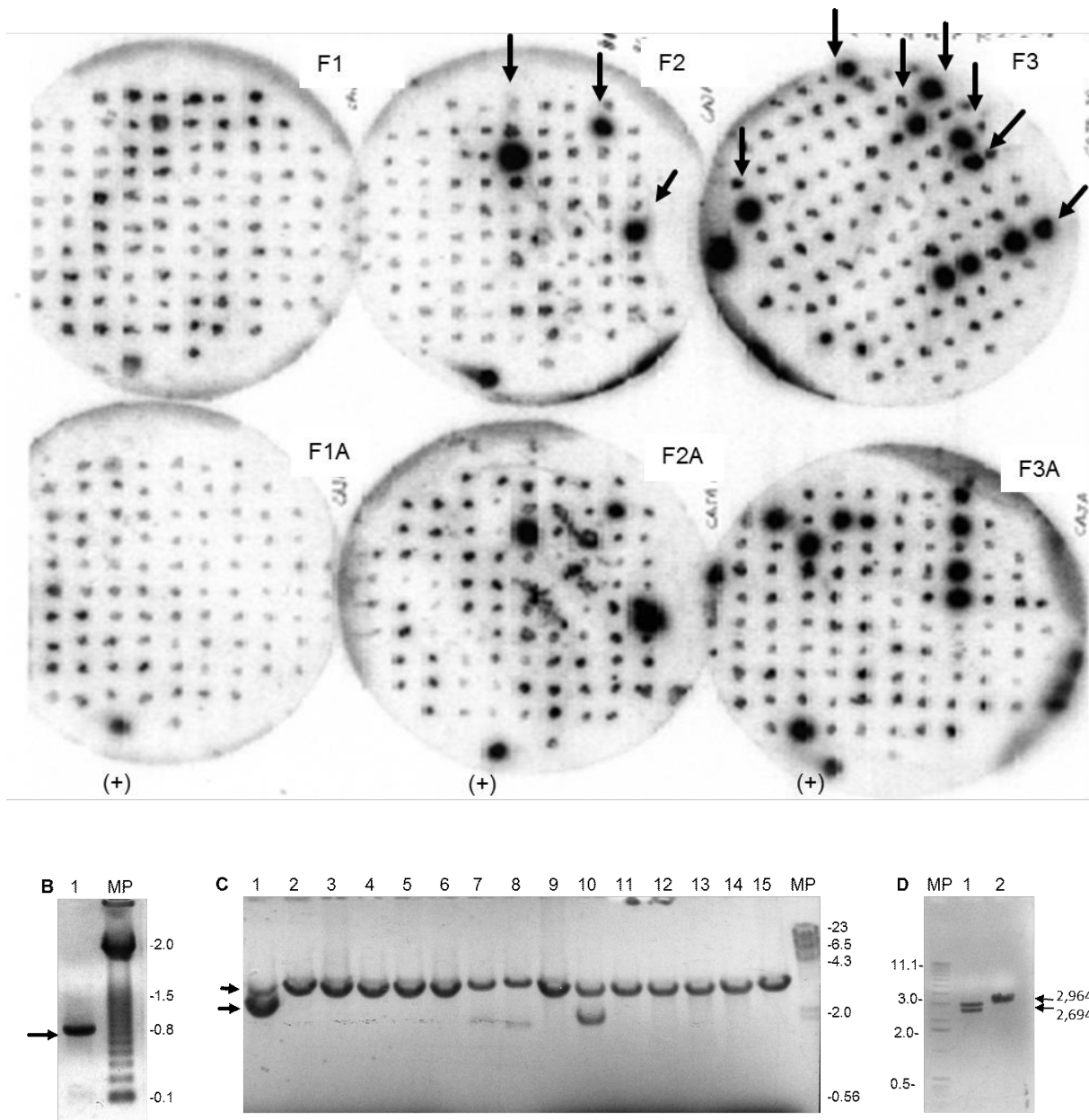


Figura 13. Aislamiento y obtención del clon de cDNA de PvPI3K.

(A) Hibridación en colonia de tres filtros con cien colonias (F1, F2 y F3) por duplicado (F1A, F2A y F3A) con la sonda PI3K desnaturalizada y con el control positivo (+, sonda PI3K, PCR de panel B). Las trece colonias marcadas positivas se señalan con flechas. **(B)** Reacción de PCR específica (gel de agarosa al 1%) **Carril 1**, sonda de PI3K amplificada por PCR de 847 pb. **MP**, marcador de peso molecular 100 pb. **(C)** Digestión con enzimas de restricción en gel de agarosa al 1%. **Carriles 1-13**, DNA de las trece colonias digeridas con *EcoRI/XhoI*, las flechas señalan el fragmento de 2,694 pb liberado del vector de 2,964 pb; **carril 14**, pBS digerido con *XhoI*; **carril 15**, pBS digerido con *EcoRI*; **MP**, marcador de peso molecular de lambda *HindIII*. **(D)** Digestión del clon seleccionado en gel de agarosa al 1%. **Carril 1**, clon pBS-PI3K digerido con *EcoRI/XhoI*; **carril 2**, pBS con *EcoRI*. **MP**, marcador de peso molecular de 1 Kb DNA.

III.2 Aislamiento del clon genómico de PI3K

El clon genómico de PI3K de poroto fue aislado con el mismo procedimiento que se utilizó para el clon de cDNA. Se hizo un tamizado con la sonda PI3K, en este caso utilizando el banco genómico de fago Lambda Dash II de *P. vulgaris*, del cual se obtuvo un clon positivo (clon 21). Para obtener la secuencia de este clon, se usó una Taq XL-Elongasa® (Invitrogen) que amplifica fragmentos de DNA de hasta 20 kb con los oligos específicos U1PI3K y L2413PI3K (**Tabla 6**). Para amplificar el clon genómico completo de 12 kb se llevó a cabo una reacción a nivel preparativo (500 µl) que se mezcló con 500 µl de glicerol al 25% en TE 50:20 mM, posteriormente se fragmentó a 14 psi de presión por 60 s con un nebulizador (**Figura 14 A**). Se concentró la muestra por precipitación clásica de DNA con acetato de sodio y etanol, posteriormente se hizo una reparación del DNA nebulizado con una reacción de *Klenow* para reparar los extremos de las cadenas y se purificó en tubos eppendorff de 0,5 mL con sephadex G50 superfino (Pharmacy). Con el fin de obtener fragmentos de DNA de alrededor de 2.000 pb, el DNA eluido de la columna se concentró por vacío y se cargó en un gel de agarosa al 1 % para cortar las bandas de ese tamaño.

Después se purificó el DNA de las bandas de agarosa en columnas Qiaquick (Qiagen) (**Figura 14 B**). Estos fragmentos se ligaron con el plásmido pZErO®-2 (Invitrogen) para ser transformado en las células competentes cepa *E. coli* One Shot TOP10 (**Figura 14 C**). De las colonias que resultaron seleccionadas en 50 µg/ml de kanamicina, se aislaron y se llevaron a cabo minipreparaciones del DNA en placas de 96 pozos. Después se verificó el DNA por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 14 D**). La secuencia completa se obtuvo en un secuenciador automático con el procedimiento *Genome Walker* (**Figura 14 E**), es decir conforme se obtenía la secuencia, se diseñaron nuevos oligos para continuar avanzando y sobrelapar fragmentos de DNA de los clones hasta obtener la secuencia completa de 13,075 pb. El análisis de la secuencia reveló una región de 1.079 pb antes del codón de inicio, seguido por 17 exones y 16 intrones que varían de tamaño desde 77 a 2,329 nt distribuidos en la región codificante. La secuencia genómica de *PvPI3K* que reportamos en la base de datos del banco de genes con el número de acceso DQ118424.2, es idéntica a la secuencia con número ID Phvul.002G070100.1 disponible en la base de datos Phytozome v11 (<http://www.phytozome.net>).

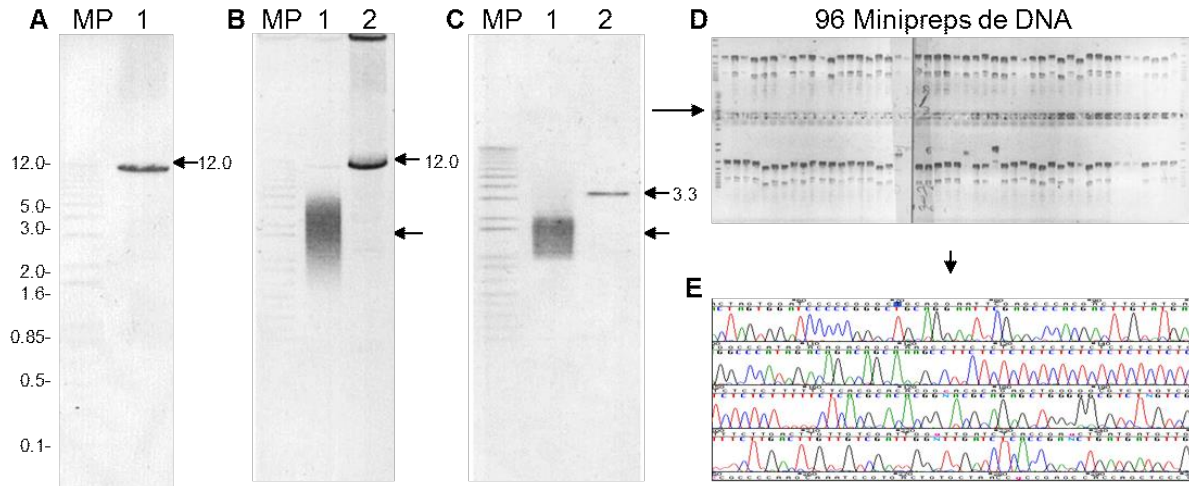


Figura 14. Secuenciación del clon genómico de PI3K.

(A) Producto específico de la reacción de PCR en gel de agarosa al 1%. **Carril 1**, producto de PCR amplificado a partir del clon genómico de PI3K. (B) Nebulización del producto específico de PCR en gel de agarosa al 1%. **Carril 1**, producto de PCR amplificado a partir del clon genómico de PI3K nebulizado; **carril 2**, no nebulizado. (C) Purificación del producto de PCR específica, nebulizada y purificada a un rango de 2 kb, en gel de agarosa al 1%. **Carril 1**, producto de PCR amplificado a partir del clon genómico de PI3K nebulizado y purificado por columna en gel; **carril 2**, plásmido pZErO linearizado con *Bam*H1. (D) DNA de 96 minipreparaciones de los clones seleccionados. (E) Ejemplo de lecturas de secuencias de DNA obtenidas con el secuenciador automático. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE1X, teñido con bromuro de etidio; **MP**, marcador 1 Kb *plus*.

III.3 Caracterización de PI3K en *Phaseolus vulgaris*

Cuando se analizó con más detalle el clon PI3K, se encontró que la unidad transcripcional contiene las regiones 5' y 3' no traducidas y un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 811 aminoácidos. Por medio del análisis de secuencia en Pfam se determinaron los dominios funcionales y se encontró que *Pv*PI3K pertenece a la subfamilia PI3K clase III. Además, se encontró el dominio estructural C2, el cual ancla las proteínas a las membranas celulares; el dominio accesorio PIK y el dominio catalítico PI3_PI4 cinasa (Vanhaesebroeck *et al.*, 2010) con motivos altamente conservados que están presentes en estas cinasas de lípidos (Herman y Emr, 1990; Hiles *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1999) (Figura 15).

atgaccggtaacgagtttgcgttcttctgtcctgocgacatcaatcttcccgtcactttccgcttgagcgtctc 75
M T G N E F R F F L S C D I N L P V T F R V E R L 25
gaaggcagttttcccttccaaattccccgattcagaaaaatgatgacccccacggagaatataatccccgagttg 150
E G S F S L S K F P D S E N D D P T E N I I P E L 50
tatgtggagtgtgcgttgtacattgatggtgcgcgctttggccttcccaccagaaccagggttgagtgccactgga 225
Y V E C A L Y I D G A P F G L P T R T R L E S T G 75
ccaccattttgttggaatgagctcatcactttaacaactaaatatcgagacttaactgctcagtcacaactcacc 300
P P F C W N E L I T L T T K Y R D L T A Q S Q L T 100
ttcactgtttgggatgtttcacatggagaaggattgattggaggagctacaattcttcttcaataacaaaaag 375
F T V W D V S H G E G L I G G A T I L L F N N K K 125
caactcaaaactgggaagcaaaaacttaggctttggacaggaagaggcagatggaacatatacctactagtaca 450
Q L K T G K Q K L R L W T G K E A D G T Y P T S T 150
cctggaaaggttcccagggcagcaacgtggggagttggagcgtttggaaaagcttgtgaacaagtatgaacgaggt 525
P G K V P R H E R G E L E R L E K L V N K Y E R G 175
caaattcagcgagtagactgggttgaccgcctcacatttagaactatggagagaatcaaggaacgtgaaagcttg 600
Q I Q R V D W L D R L T F R T T M E R I K E R E S L 200
aaaaatgaaagttctcattacctggttgtagacttctgtagttttgagcatcgagttgtttttcaggaatcaggt 675
K N E S S H Y L V V D F C S F E H R V V F Q E S G 225
gctaattttttgttgccatctcctatagcttcaaccaatgatattgttattgtctgggatccagaagtgggaaaag 750
A N F L L P S P I A S T N D I V I V W D P E V G K 250
ataaatccctctgagcacaacagttaaagctggctaggagtttgactcgtgggtgcatagacagggatctgaaag 825
I N P S E H K Q L K L A R S L T R G V I D R D L K 275
ccaagctcaaatgagaggaagtcaattcagagaactaaaataccaccaacaaggactttgagtggtgatgag 900
P S S N E R K S I Q R I L K A Y P P T R T L S G D E 300
aggcagctcttggtaaattccgcttctctttgatgtctgaaaagaggctcttacaagttcccttctgtgtt 975
R Q L L W K F R F S L M S E K R A L T K F L R C V 325
gaatggagtgatgttcaggaagcaaaacagcattagaattgatggcaagtgggaaatgattgatgtttctgat 1050
E W S D V Q E A K Q A L E L M G K W E M I D V S D 350
gcactggaacttttgcctcctgtttttgaaagtgaagaggtccgtgcttatgcagttagtggttcttgaagagct 1125
A L E L L S P V F E S E E V R A Y A V S V L E E R A 375
gatgatgaagagcttcagtgctacttgcctcaattggttcaggctcttcgggttgagcgttctgacaaatctcgt 1200
D D E E L Q C Y L L Q L V Q A L R F E R S D K S R 40
ctttcacacttcccttgcacaacgtgcattatgcaatattgaattggcaagctttcttcgctggatgtggctgtt 1275
L S H F L V Q R A L C N I E L A S F L R W Y V A V 425
gaactttatgatcctgcataatgccaaacgattttactgcacttatgagattctggaggagaatgatgaagatg 1350
E L Y D P A Y A K R F Y C T Y E I L E E N M M K M 450
gcagctggtggaatgagaggaagatgggtttaaacagtgccagagtttggtacgcccagactgaattgacagct 1425
A A G V N G E E D G F K Q S L V R Q T E L T A 475
cagttgtgttgatcactagagatgtaaggaatgctcgtggtaatacacagaagaagattgaaaaacttagacaa 1500
Q L C S I T R D V R N V R G N T Q K K I E K L R Q 500
ctactttctggtcttctcagtgaaacttacctatgtgacgagccaataacgatcacctttggcacctggtgtcctc 1575
L L S G L L S E L T Y F D E P I R S P L A P G V L 525
attagtggtattgtacctcagagtcacaatatttaagagtgactgcacatcctctgcgccttacttttgaaca 1650
I S G I V P S E S S I F F K S A L H P L R L T F T R A 550
acaaatggtggaactagtaaaattatatttaaaaaggagatgatattcggcaggaccagttggttgcataatg 1725
T N G G T S K I I F K K G D D I R Q D Q L V V Q M 575
gtatccctaattggaccgattacttaagctggaaaatcttgatttgcacctcacaccatacaaggtgctagcaact 1800
V S L M D R L L K L E N L D L H L T P Y K V L A T 600
ggacaagatgaaggcatggttgaatttattccatctcgttcattggcccagattttatcagagcatcgtagcatc 1875
G Q D E G M L E F I P S R S L A Q I L S E H R S I 625
ataagctatttgcagaaatatacctcctgatgaccatgggccttttggaaatcacagccacctgcctggaactttt 1950
I S Y L Q K Y H P D D H G P F G I T A T C L E T F 650
ataaaaaagctgtgctggtactctgttatcacatatatacttggatcggagccaggcattttggacaatctcctc 2025
I K S C A G Y S V I T Y I L G I G A R H L D N L L 675
cttagaaatgatggaggtcttttccatgtcgattttggttttattcttgggagagatcctaagccatttccacct 2100
L R N D G G L F H V D F G F I L G R D P K P F P P 700
ccaatgaagctttgcaaggaaatggtgaggcaatgggtggagctgaaagccaatattatacaaggttcaagtc 2175
P M K L C K E M V T E A M G G A E S Q Y Y T R F K S 725
tattgttgaagcacaacattcttcgcaaatccagtaacctaattttaaatctattttacttaattgggggt 2250
Y C C E A Y N I L R K S S N L I L N L F Y L M A G 750
tccaatattcctgacatagtttctgatcctgaaaagggattcttaagcttcaggagaagtttcggttgagcttg 2325
S N I P D I V S D P E K G I L K L Q E K F R L D L 775
gacgatgaagctagtatacatttcttccaggatctgattaatgagagtggtgacttattccctcagatggtt 2400

D D E A S I H F F Q D L I N E S V S A L F P Q M V	800
gagactatccatcgttgggctcaatattggcggttaa	2436
E T I H R W A Q Y W R .	811

Figura 15. Secuencia de nucleótidos del clon de cDNA de PI3K de *P. vulgaris* y la secuencia de aminoácidos deducida. El clon comprende 2.436 nt de la región codificante, en el dominio C2 se señala el codón de inicio atg y un probable sitio PEST (140-150 aa) de procesamiento proteico (color azul y subrayado); el dominio helicoidal (color verde); y dominio catalítico con los motivos característicos de cinasa GDDD(I/L)RQD y LGVGDRH (subrayados en color café). Las flechas indican los sitios de los oligonucleótidos para la sonda (1.117-1.958 nt), qPCR (1.350-1.431 nt) y para el RNAi (1.860-2.397 nt).

III.4 El gen de PI3K de clase III de *P. vulgaris* codifica una cinasa conservada

La secuencia del gen completo de la PI3K se analizó con BLAST en la base de datos de Phytozome v11 (<http://www.phytozome.net>). Se encontró un solo gen localizado en el cromosoma 2, muy similar en la estructura (17 exones y 16 intrones) a la *AtVps34* de *Arabidopsis* (**Figura 16 A**). En el análisis comparativo del gen PI3K de poroto con 17 genes PI3K de plantas (**Tabla 7**), se encontró que esta organización genómica está conservada, excepto en Chlorophytas, como las *Micromonas sp*, en las que PI3K tiene solamente un exón y carece de intrones, y en *Chamydomonas reinhardtii*, donde PI3K contiene 18 exones y 17 intrones. Estos resultados mostraron una estructura genómica muy conservada, por lo que se decidió hacer una árbol filogenético de PI3Ks clase III de diferentes especies.

III.4.1. Estudios Bioinformáticos

Para construir el árbol filogenético se utilizaron treinta secuencias de aminoácidos PI3K clase III reportadas en otros eucariotas (**Tabla 7**). El alineamiento múltiple de secuencias se realizó usando el algoritmo ClustalW y el árbol filogenético fue generado usando el método “neighbor-joining” con 1000 ensayos de rutina (*bootstrap trials*) para soporte estadístico de los clados resultantes. El árbol filogenético fue generado usando el programa MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>; Tamura *et al.*, 2011) (**Figura 16 B**).

Con el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de enzimas PI3Ks clase III se encontró un alto nivel de identidad de la PvPI3K con las isoformas de soja, en particular un 94,7% con la isoforma de nódulo (*GmPI3K1*) y 95,1% con la isoforma de raíz (*GmPI3K5*; Hong y Verma, 1994). Además se encontró una identidad de 93,5% con *M. truncatula* (*MtPI3K*) y 83,4% con la *AtVPS34* de *A. thaliana* (Hernández *et al.*, 2004; Welter *et al.*, 1994; (Anexo 1).

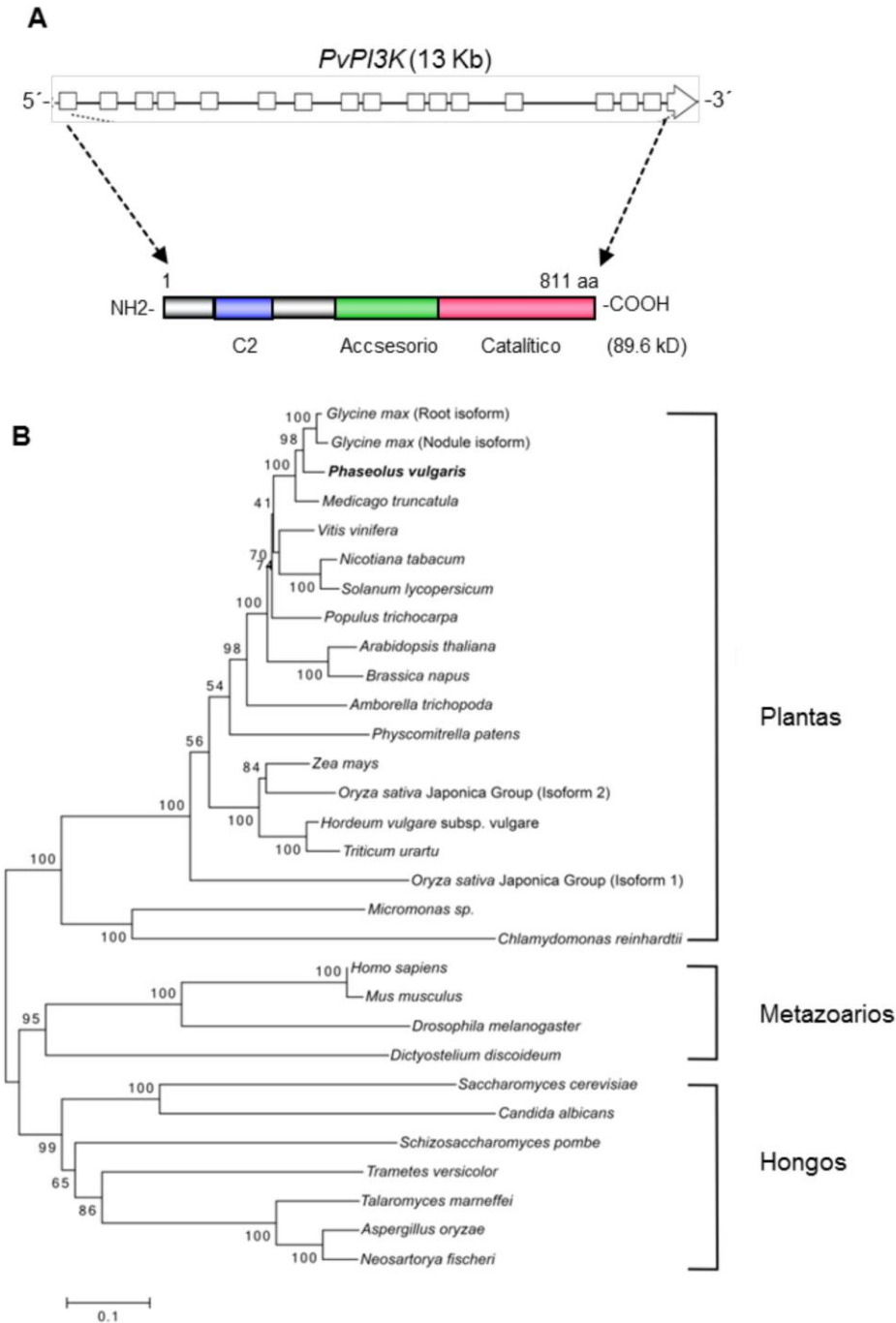


Figura 16. Organización del gen, la proteína y el análisis filogenético de PI3Ks clase III.

(A) Estructura del gen codificante para *PvPI3K*. Se muestran los exones (en cajas) e intrones (en líneas), las flechas punteadas señalan la proteína con los tres dominios característicos (C2, accesorio y cinasa). **(B)** Árbol filogenético de la secuencias de aminoácidos representativas de PI3K clase III. *P. vulgaris* se muestra en letra resaltada y los reinos a la derecha. La escala en el eje x representa las longitudes estimadas de la rama y los números indican los valores de arranque. El alineamiento completo puede verse en la **Figura Anexo 1** del apéndice.

El árbol filogenético construido muestra el grupo de plantas con *PvPI3K* en el clado de la familia *Fabaceae*, un subgrupo de microalgas, *Dictyostelium* y el grupo de los hongos (**Figura 16 B**). El árbol es congruente con el nivel taxonómico de los organismos incluidos ya que *PvPI3K* se agrupó con plantas dicotiledóneas por separado de las monocotiledóneas (*Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Triticum urartu*, y *Oryza sativa*). La estructura de genes y el análisis filogenético revelan un alto grado de conservación de la secuencia, lo que sugiere la conservación de la función entre las PI3Ks de plantas.

III.5 Construcción de RNAi para el mensajero de *PvPI3K*

Con el propósito de reducir los niveles de transcrito de PI3K de poroto, se utilizó un RNA de interferencia (RNAi) diseñado para formar estructuras tallo-asa que se expresan en un plásmido de silenciamiento de genes para plantas. Para obtener esta construcción se usó la tecnología Gateway® de Invitrogen™ que facilita la clonación de secuencias nucleotídicas de interés en vectores binarios como el plásmido de silenciamiento, usando las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago lambda (Landy, 1989).

Los vectores binarios tienen sitios para permitir su replicación en *E. coli* y *Agrobacterium*, este último permite la transformación en plantas por medio de la transferencia del DNA recombinante (llamado T-DNA) a las células vegetales. El procedimiento Gateway se basa en reacciones de recombinación sitio-específicas utilizando componentes lambda modificados. El método consiste en seleccionar la secuencia blanco para que funcione de forma específica (en este caso el RNAi), la cual se clona en un plásmido de entrada y después el fragmento de DNA se puede mover a un vector de destino.

Los componentes claves de la recombinación involucran las secuencias de recombinación de DNA de los sitios *att*, (*de attachment*) y una mezcla proteínas recombinantes con Clonasa™ para llevar a cabo la reacción de recombinación. La reacción LR Clonasa es la que facilita la recombinación que ocurre entre sitios *attL1* y sitios *attR* que sirven como sitios de unión para las proteínas recombinantes. El siguiente diagrama muestra la reacción de recombinación LR que se llevó a cabo entre el vector de entrada pENTR-*PvPI3K* y el vector de destino pTDT-DC-RNAi para crear el plásmido pTDT-*PvPI3K*-RNAi (**Figura 17**).

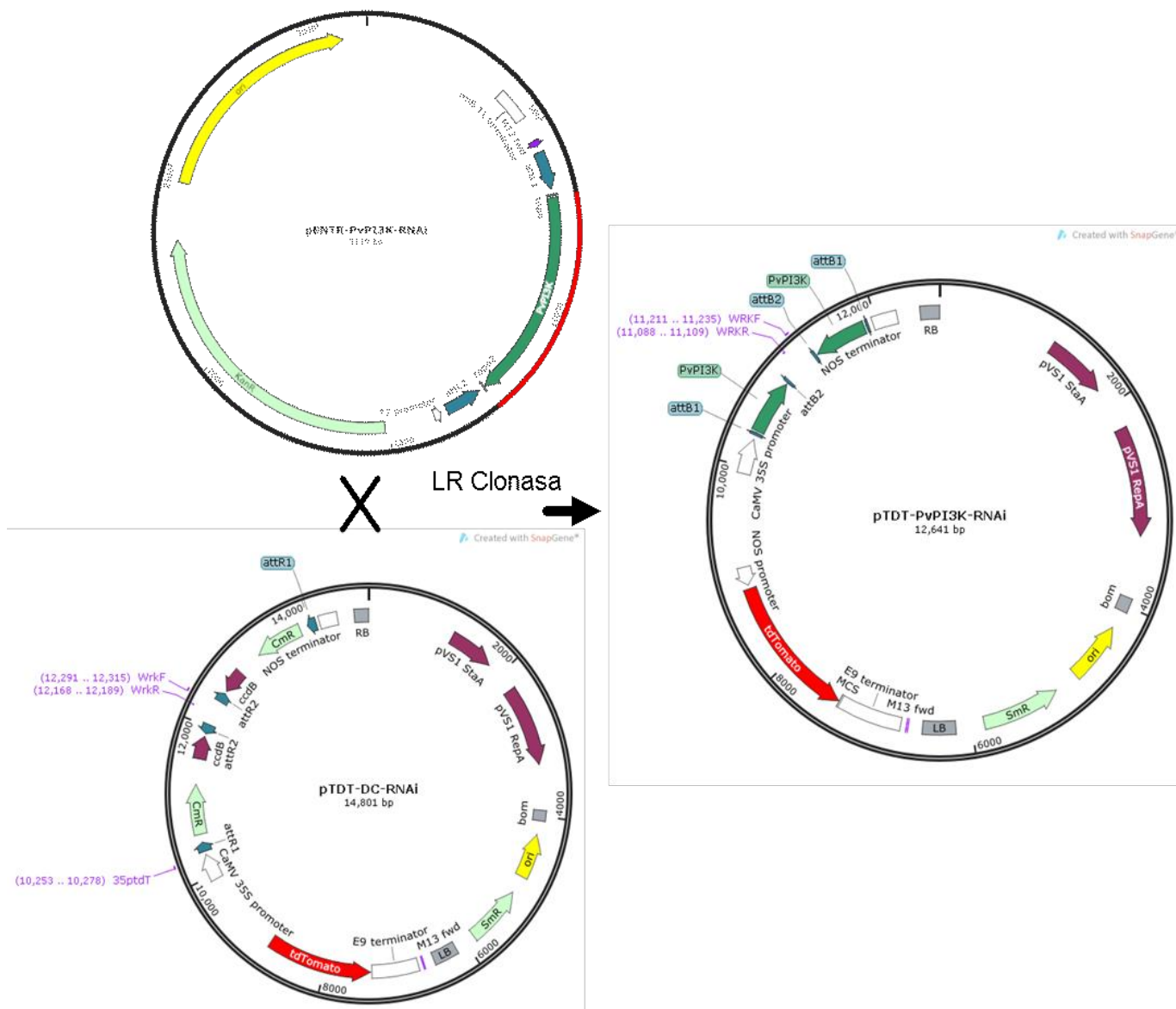


Figura 17. Diagrama de obtención del clon pTDT-PvPI3K-RNAi.

Reacción de recombinación con LR Clonasa entre el plásmido de entrada pENTR-PvPI3K (sitios *attL*) y el destino pTDT-DC-RNAi (sitios *attR*) para crear el plásmido pTDT-PvPI3K-RNAi con los elementos necesarios para silenciar el transcrito de *PvPI3K* de *P. vulgaris*. El plásmido binario permite la expresión del RNAi bajo la regulación del promotor constitutivo CaMV 35S; expresa la proteína roja fluorescente *tdTomato* como marcador molecular de las raíces de la planta; presenta un intrón WRKY entre las invertidas repetidas del RNAi para la formación de una estructura tallo asa y contiene un gen de resistencia a espectinomicina. El *cassette* con el gen *ccdB* para selección negativa y el de resistencia a cloranfenicol (Cm^r) son desplazados por el fragmento *PvPI3K*-RNAi. RB, borde derecho y LB, borde izquierdo. Los mapas se diseñaron con Snap Gene ViewerR 3.2.1.

Para obtener el *PvPI3K*-RNAi, se diseñaron oligonucleótidos dirigidos hacia el C terminal de la región codificante de *PvPI3K* (**Figura 15**), considerando que este fragmento fuera específico de la secuencia y no así de otros genes del genoma de *P. vulgaris*. Para esto se consultó el sitio de Phytozome vc11. Usando como molde el clon obtenido del banco de cDNA, se amplificó por PCR un fragmento de 537 pb con oligos específicos (**Tabla 6**) para que el producto de PCR pudiera ser clonado de forma direccional en el vector Gateway de entrada pENTR™/D-TOPO (**Figura 18 A-B**).

Para aislar el clon con la inserción direccional en el pENTR™/D-TOPO, una alícuota de la reacción se transformó en células competentes *E. coli* TOP10 que fueron seleccionadas en medio LB con kanamicina y corroborado por PCR. Posteriormente se hizo la purificación del plásmido del clon positivo denominado pENTR-*PvPI3K*-RNAi para secuenciación y posterior recombinación. El inserto del clon obtenido quedó flanqueado por sitios *attL1* y *attL2* del vector que le permiten recombinarse con los sitios compatibles *attR1* y *attR2* del vector destino.

El plásmido de entrada pENTR-*PvPI3K*-RNAi se recombinó con el vector binario pTDT-DC-RNAi por medio de una reacción con la LR clonasa II (**Figura 18**) que permitió la inserción doble de los fragmentos *PvPI3K*-RNAi en forma invertida repetida para formar la estructura tallo asa de silenciamiento del transcrito de *PvPI3K*. En la célula esta estructura formada por el RNA doble cadena es procesada por un complejo enzimático en fragmentos de RNAs pequeños (de longitud uniforme alrededor de 25 nt), los cuáles posteriormente son reconocidos por otro complejo enzimático. El siguiente complejo se encarga de separar la doble cadena de los RNAs pequeños y una de ellas reconoce su cadena complementaria como secuencia blanco en el mRNA. De ésta forma se inhibe de forma específica la expresión del gen correspondiente (Baulcombe, 2004).

Se usó una alícuota de la reacción de recombinación LR y se transformaron células de *E. coli* DH5α para su selección. Los clones que retienen el gen *ccdB* (*control of cell death*) no crecen ya que interfieren con una DNA girasa de *E. coli* (DH5α y TOP10) inhibiendo su crecimiento (Bernard y Couturier, 1992; Bernard *et al.*, 1993; Miki *et al.*, 1992). La doble recombinación se comprobó en tres clones mediante ensayos de PCR utilizando los oligonucleótidos internos del vector WRKY-5-Rv o WRKY-3-Fw con el oligo específico de la PI3K-RNAi (**Figura 18 C**). Se aisló el plásmido de uno de los clones y se comprobó la orientación del inserto al secuenciar con los oligonucleótidos internos (WRKY) del vector. Una vez que se comprobó que la construcción estaba correcta, fue introducida en *Agrobacterium rhizógenes* K599 por electroporación. La transformación fue comprobada por ensayos de PCR y las colonias positivas fueron seleccionadas para su posterior uso en la transformación de plantas de poroto.

III.6 La pérdida de la función de *PvPI3K* disminuye la autofagia

El plásmido pTDT-*PvPI3K*-RNAi que contiene el *PvPI3K*-RNAi se transformó en *Agrobacterium rhizogenes* K599 para generar raíces pilosas (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). Se utilizó como control la construcción denominada en este trabajo pTdT-Sac-RNAi, la cual contiene una secuencia irrelevante obtenida por Montiel *et al.* (2012). Las raíces transgénicas fueron seleccionadas con base a la expresión del gen *tdTomato* (dímero en tándem de tomate) que codifica para la proteína roja fluorescente (Shaner *et al.*, 2004). Este marcador permitió monitorear y seleccionar las raíces transgénicas y descartar las raíces no fluorescentes desde el inicio de la emergencia de las raíces del callo.

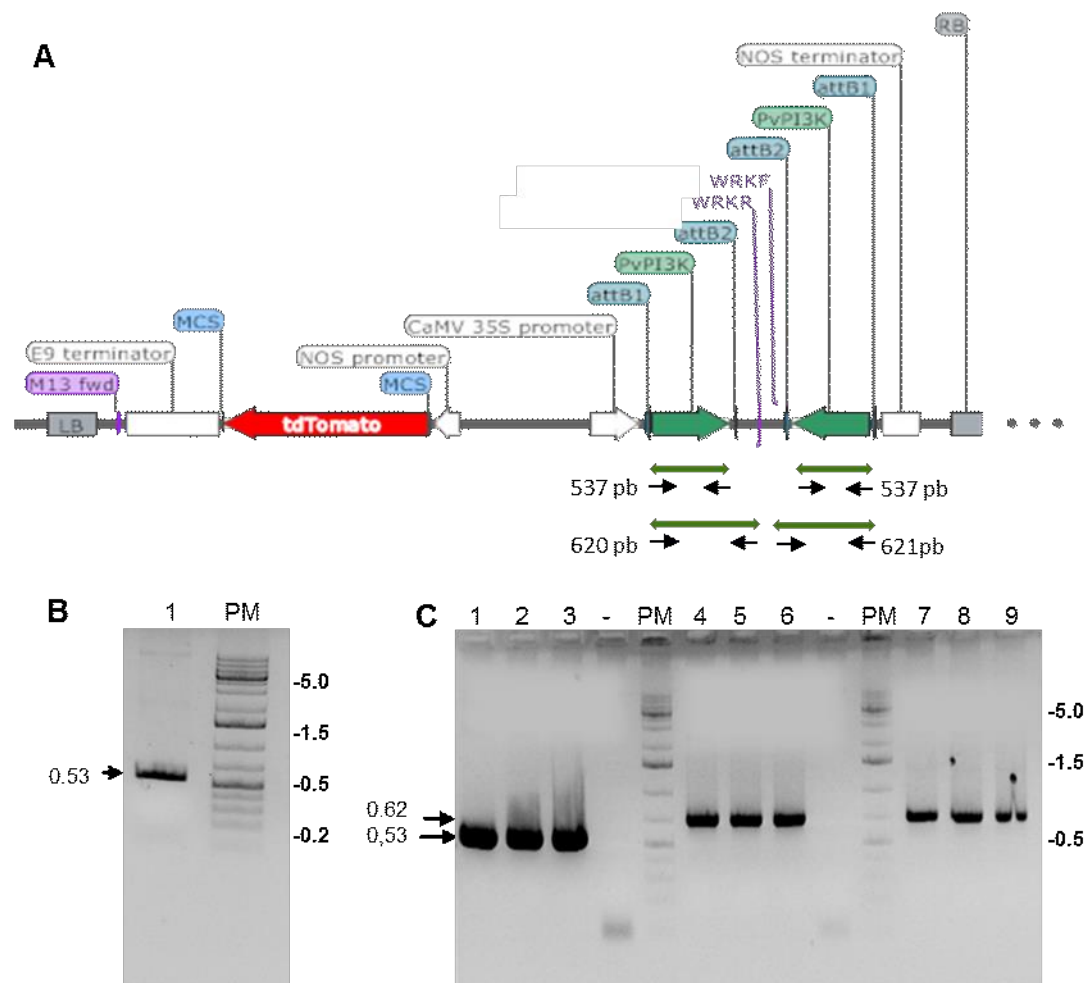


Figura 18. Construcción del RNA de interferencia para el mensajero de *PvPI3K*.

(A) Mapa del DNA móvil del vector binario que indica los sitios donde se localiza el gen reportero *tdTomato* bajo el promotor NOS, seguido por el RNAi que consta de un intrón WRKY flanqueado en los extremos con las dos secuencias de *PI3K* invertidas bajo el

Figura 18. Continuación. promotor CaMV 35S. También se señala el borde izquierdo (LB) y derecho (RB) del DNA móvil. **(B)** Resultado del PCR específico en gel de agarosa al 1%. **Carril 1**, el producto de PCR de 537 pb obtenido a partir de cDNA de nódulo con los oligos PI3K_F y PI3K_R y clonado en el pENTR-TOPO/TA. **(C)** Productos de PCR resultado de la recombinación de pENTR-PvPI3K con el vector pTDT-DC-RNAi en gel de agarosa al 1%, **carriles 1-3**, el PCR se realizó usando los oligos específicos del inserto PvPI3K-RNAi_F y PvPI3K-RNAi_R. **Carriles 4-6**, PCR con los oligos del vector WRKY_F o **carriles 7-9**, WRKY_R y el oligo específico de PI3K. Para cada juego de oligos, se muestra el resultado para tres colonias de *E. coli* DH5 α que crecieron en espectinomicina de un tamizado de 10 colonias. Las flechas indican el tamaño de los productos de PCR obtenidos y los números a la derecha del gel indican el tamaño esperado de los fragmentos amplificados de acuerdo al mapa de arriba **(A)**. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio; (-), control negativo; **PM**, marcador de peso molecular 1 kb *plus*.

En las raíces transgénicas que expresan el *PvPI3K-RNAi* específico, se evaluó la acumulación de transcritos por medio de RT-qPCR y se encontró una disminución de *PvPI3K* de aproximadamente $66,3\% \pm 2,3$. Para saber si los miembros asociados al centro del complejo PI3K/VPS34 que se conocen en levadura estaban afectados por esta disminución, se buscaron los genes ortólogos correspondientes en Phytozome (www.phytozome.jgi.doe.gov). Se encontró el gen para la proteína VPS15 que es la subunidad regulatoria de la actividad de PI3K/VPS34, así como el de la proteína accesoria VPS30/BECLINA1 que se sabe forman parte del multicomplejo proteico requerido para autofagia en levadura (Stack *et al.*, 1993; Stack *et al.*, 1995; Kametaka *et al.*, 1998; Kihara *et al.*, 2000a). Se encontraron los tres componentes del núcleo (*core*, *PvPI3K/Vps34*, *PvVps15*, y *PvBeclina1*) del complejo en *P. vulgaris*, excepto el adicional *Atg14*, gen que tampoco se ha reportado en plantas (Levine y Klionsky, 2004).

En las raíces transgénicas que expresan el *PvPI3K-RNAi* específico, se evaluó la acumulación de transcripción de genes que codifican para proteínas asociadas al núcleo de autofagia (*PvPI3K*, *PvVps15*, y *PvBeclina1*), así como del gen marcador universal de autofagia *PvAtg8*. La evaluación se hizo por RT-qPCR en raíces de *P. vulgaris* con pérdida de función de *PvPI3K* con una disminución de expresión de $66,3\% \pm 2,3$ de *PvPI3K*, también se observó disminución en la expresión de los genes *PvVps15* ($79,4\% \pm 2,28$) y *PvBeclina1* ($59\% \pm 3,4$) en comparación con las raíces del control con pTDT-Sac-RNAi (**Figura 19**).

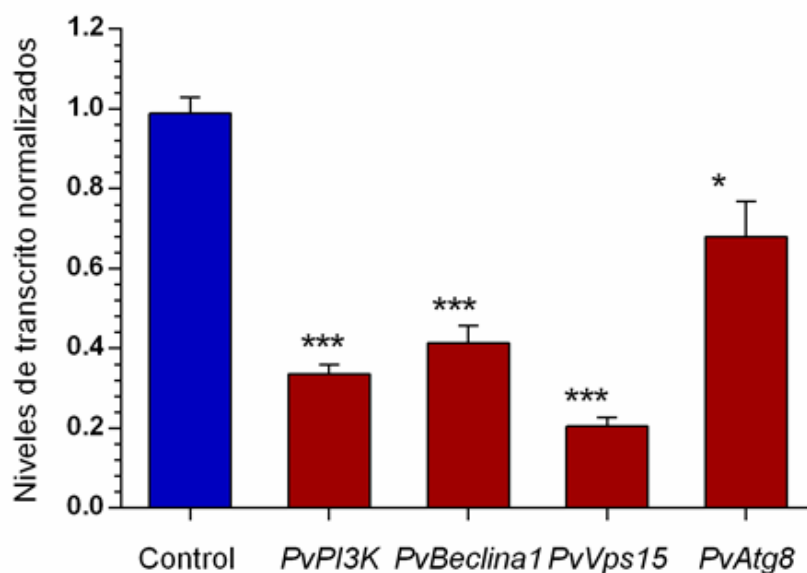


Figura 19. La pérdida de la función de *PvPI3K* disminuye los niveles de transcrito de genes de autofagia.

Las raíces transgénicas de *P. vulgaris* con el *PvPI3K*-RNAi con una reducción en los niveles de transcrito de *PvPI3K* de aproximadamente el 66%, fueron evaluadas por análisis de RT-qPCR para cuantificar *PvBeclina1*, *PvVps15* y *PvAtg8*. Los cálculos de los niveles de transcrito normalizados se hicieron usando como gen de referencia el *EF1α*, como se describe en la sección (II.6.7.2). Las barras indican la media \pm DS (desviación estándar) de dos experimentos ($n = 2$ a partir de un conjunto de 8 raíces transgénicas). Las diferencias significativas se determinaron estadísticamente mediante la prueba de *t*-Student (* $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$).

Además se encontró que el nivel de transcrito de *PvAtg8*, que desempeña un papel crucial en el crecimiento y la maduración del autofagosoma, también se redujo en un $32,1 \pm 9,2\%$ en las plantas con pérdida de función *PvPI3K* en comparación con las raíces control transformadas con pTDT-Sac-RNAi como puede observarse en la **Figura 19**.

Entre los genes con nivel de transcripción reducido se encontró a *PvBeclina1*, el cual codifica para una proteína de andamio necesaria para la función del complejo VPS34 que participa en la autofagia. En *A. thaliana*, mutantes deficientes en *Beclina1* (*bcl1*) tienen defectos de germinación de polen, enanismo y senescencia temprana. Los genes implicados en el metabolismo de PI y la señalización y el sistema de anclaje GPI (glicosil-PI) también se alteran significativamente en las plantas mutantes (Qin *et al.*, 2007). Además en *Nicotiana benthamiana* *PI3K/Vps34*, *Beclina1* y otros genes de autofagia (*Atgs*) se requieren para la restricción de la respuesta hipersensible (HR) en la muerte celular programada (Liu *et al.*, 2005). Estos últimos hallazgos sugieren una conexión entre los

componentes de autofagia (PI3K/Vps34-Beclina1-Atgs) en la relación planta-microorganismo.

Para saber si *PvBeclina1*, el potencial ligando de *PvPI3K*, tiene relación con la simbiosis nodular, se usó una construcción con un RNAi interferente para analizar los efectos de la pérdida de la función de *PvBeclina1* en raíces transgénicas de frijol inoculadas con *Rhizobium tropici*. Se utilizó el plásmido pTDT-Beclina1-RNAi obtenido con el procedimiento Gateway en el trabajo de Tesis de Maestría de Neftaly Cruz (2014) en las raíces transgénicas generadas con el mismo procedimiento descrito para *PvPI3K* (ver sección II.8.4). Como se muestra en la **Figura 20 A**, el nivel de transcrito de *PvBeclina1* se redujo en un $78,68 \pm 2,74\%$ en raíces *PvBeclina1*-RNAi en comparación con las raíces control con el vector control TdT-*Sac*-RNAi. Adicionalmente se observó a los 21 dpi, la disminución del número de nódulos de la raíz, la cual fue drástica (aproximadamente 40 veces) con la pérdida de la función de *PvBeclina1* (**Figura 20 B**). Estos resultados del fenotipo deteriorado en simbiosis durante la pérdida de función de *PvBeclina1* demuestran una conexión de autofagia con la función simbiótica en las raíces de poroto.

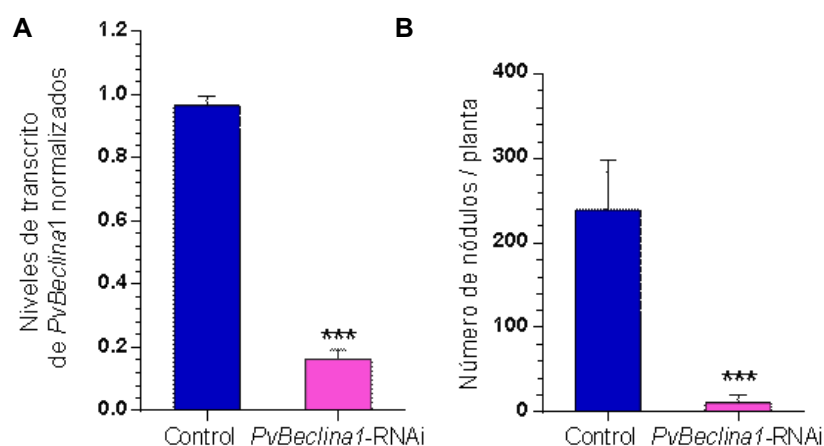


Figura 20. La pérdida de la función de *Beclina1* disminuye la nodulación.

(A) Los niveles de transcrito de *PvBeclina1* se cuantificaron por RT-qPCR en las raíces transgénicas que expresan *PvBeclina1*-RNAi y en las raíces con el control (TdT-*Sac*-RNAi) a 14 días post infección con *Agrobacterium*. Los niveles de transcrito se normalizaron utilizando el gen de referencia *EF1a* como se describe en la sección II.6.7.2. Las barras hacen referencia a la media \pm DS de cuatro experimentos ($n = 4$ de un conjunto de 10 raíces). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (prueba *t*-Student; *** $P < 0,001$). **(B)** El número de nódulos de raíces control y en raíces *PvBeclina1*-RNAi a los 21 dpi con *R. tropici* CIAT899. Las barras representan la media \pm DS ($n = 12$ plantas compuestas). Las diferencias estadísticamente significativas fueron confirmados por la prueba de *t*-Student (*** $P < 0,001$).

CAPITULO IV
EFFECTOS DE PI3K EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA,
LA FOTOSÍNTESIS Y LA INTERACCIÓN TEMPRANA
CON RIZOBIOS

IV.1 Niveles de transcrito de PI3K en las raíces silvestres de *Phaseolus vulgaris*

Los reportes de los niveles de transcrito de PI3K varían entre las diferentes partes de las plantas leguminosas. En el análisis de la expresión de PI3K en soja se observó que la isoforma de raíz (SPI3K-5) que se expresa en raíces no inoculadas, se induce en nódulos maduros de 35 días post inoculación (dpi) con *Bradyrhizobium japonicum*, mientras que la isoforma de nódulo (SPI3K-1) se induce durante la organogénesis del nódulo entre los 12 a 21 dpi (Hong y Verma, 1994). En *Medicago truncatula* y *M. sativa* se observaron los niveles más altos en tallos jóvenes y en nódulos comparados con meristemas, hojas y raíces no infectadas (Hernández *et al.*, 2004). De acuerdo a estos resultados, la acumulación de transcritos PI3K se asoció con la división celular en tallos en elongación y con la proliferación de membrana en los nódulos, sugiriendo el modo de acción de esta proteína. Para conocer los niveles de expresión de PI3K en *P. vulgaris*, se analizaron nódulos, hojas, raíces, flores y tallos de plantas inoculadas con *R. tropici* y se encontraron los niveles más altos en las raíces inoculadas (Figura 21 A). Sin embargo cuando se analizó la organogénesis del nódulo, se encontró una curva de expresión con los niveles más altos en nódulos maduros alrededor de los 18 a 20 dpi con *R. tropici* (Figura 21 B), señalando su importancia durante la simbiosis efectiva.

Utilizando el Atlas de expresión génica de *Phaseolus vulgaris*, (PvGEA; <http://plantgrn.noble.org/PvGEA/>; O'Rourke, *et al.*, 2014) basado en datos de secuenciación de RNA (RNA seq), se graficó el perfil de expresión génica de *PvPI3K* (GeneID: Phvul.002G070100.1) en las diferentes partes de la planta y los niveles tres veces más altos se encontraron en brotes, incluyendo el meristema apical colectado en la etapa del segundo trifolio, en raíces de plantas fertilizadas, en raíces desnoduladas, en hojas y en nódulos inefectivos de 21 dpi (Figura 22).

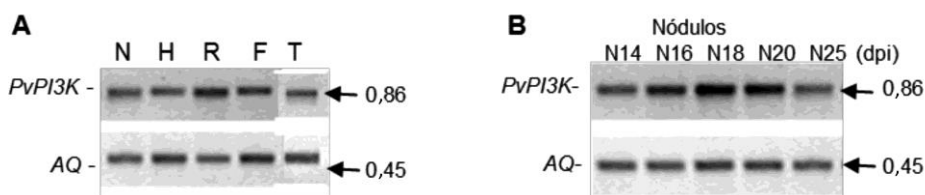


Figura 21. Niveles de expresión del gen *PvPI3K* en *Phaseolus vulgaris* silvestre inoculado con *R. tropici* CIAT899.

(A) Productos de RT-PCR de nódulos (N), hojas (H), raíces (R), flores (F) y tallos (T). (B) Nódulos de 14 (N14), 16 (N16), 18 (N18), 20 (N20) y 25 (N25) dpi. Las reacciones de RT-PCR se prepararon a partir de RNA de diversas partes de la planta para sintetizar el cDNA y la PCR se llevó a cabo con oligos para los genes de *PvPI3K* y de Acuarporina (*PvAQ*) como gen de referencia. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE1X, teñido con bromuro de etidio. Los números con flechas indican el tamaño de los fragmentos de DNA en kb.

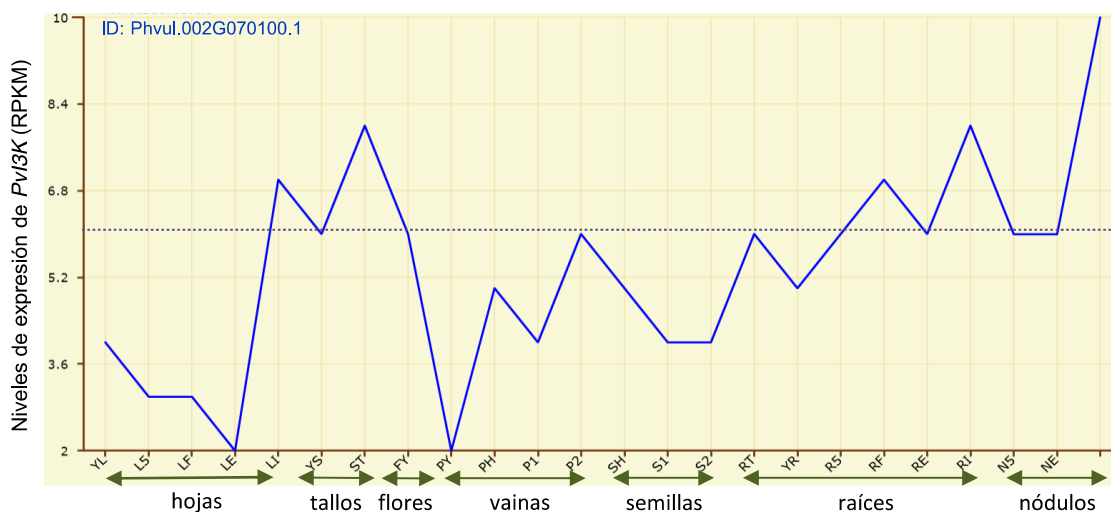


Figura 22. Perfil de expresión de PvPI3K de acuerdo al Atlas de Expresión Génica de *Phaseolus vulgaris*; PvGEA (cv. Negro Jamapa).

Perfiles de expresión génica en: hojas, tallos, flores, vainas, semillas, raíces y nódulos en diferentes etapas de desarrollo en condiciones ideales de crecimiento de 24 muestras únicas. La gráfica para el gen PvPI3K (ID: Phvul.002G070100.1) se hizo de acuerdo a la base de datos disponible en <http://plantgrn.noble.org/PvGEA/>. Los valores normalizados se asignan como RPKM (del inglés, *Reads per Kilobase of sequence per Millon Mapped Reads*) son la medida de abundancia del mRNA (O'Rourke et al., 2014).

-R5-Raíces enteras separadas de pre-nódulos fijadores de 5 días de edad. -RF-Raíces enteras de plantas fertilizadas colectados, al mismo tiempo que RE y RI. -RE-Raíces enteras separadas de nódulos fix+ colectados 21 días después de la inoculación. -RI-Raíces enteras separadas de nódulos fix- colectados 21 días después de la inoculación. -N5-Nódulos pre-fijación (efectivos) colectados 5 días después de la inoculación. -NE-Nódulos que fijan colectados 21 días después de la inoculación. -NI-Nódulos fijadores ineficaces colectados 21 días después de la inoculación. -YL-Hojas de segundo trifolio totalmente expandido de plantas dotadas de fertilizante. -LS-Hojas colectadas 5 días después las plantas se inocularon con *Rhizobium* efectivo. -LF-Hojas de las plantas fertilizadas recogidas en el mismo momento de LE y LI. -LE-Hojas colectadas 21 días después que las plantas se inocularon con *Rhizobium* efectivo. -LI-Hojas colectadas 21 días después que las plantas se inocularon con *Rhizobium* ineficaz. -YS-Todos los entrenudos del tallo por encima de los cotiledones colectados en la etapa del segundo trifolio. -ST-Brotos de punta, incluyendo el meristema apical, colectados en la etapa del segundo trifolio. -FY-Flores jóvenes, colectadas antes de la emergencia floral. -PY-Vainas jóvenes, colectadas 1 a 4 días después de la senescencia floral. Muestras que contienen el desarrollo de embriones en etapa globular. -PH-Vainas de aproximadamente 9 cm de largo, asociado con las semillas en la etapa del corazón (solo vaina). -P1-Vainas de entre 10 y 11 cm de largo, asociadas con las semillas etapa 1 (sólo vaina). -P2-Vainas de entre 12 y 13 cm de largo asociados con las semillas etapa 2 (sólo vaina). -SH-Semillas de la etapa del corazón, entre 3 y 4 mm de diámetro y aproximadamente 7 mg. -S1-Semillas, etapa 1, entre 6 y 7 mm de diámetro y aproximadamente 50 mg. -S2-Semillas, etapa 2, entre 8 y 10 mm de ancho y entre 140 y 150 mg. -RT-puntas de raíz, de 0,5 cm de tejido, recogidas de las plantas fertilizadas en la 2da etapa trifoliada de desarrollo. -YR-Raíces enteras, incluyendo puntas de las raíces, recogidas en la segunda etapa del desarrollo trifoliado. -NI-Nódulos fijadores ineficaces colectados 21 días después de la inoculación.

Debido que las raíces inoculadas y los nódulos mostraron un incremento de la expresión de PI3K en *P. vulgaris*, se cuantificaron los niveles de transcrito de los pelos radicales que son vía de entrada de los rizobios a la raíz. Se encontró por RT-qPCR que los niveles del transcrito de *PvPI3K* son más altos en los pelos radicales que en raíces rasuradas de pelos radicales y que en el ápice de la raíz. Esto demuestra que su expresión es específica del tejido (**Figura 23 A**).

IV.2 Niveles de transcrito y su localización durante la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici*

Para evaluar los niveles de transcrito de PI3K en las raíces de *P. vulgaris* en presencia de *R. tropici*, se llevó a cabo una cinética de raíces inoculadas *versus* no inoculadas en etapas tempranas (0-144 horas) y en etapas tardías (10-30 días). Se colectaron raíces de las plántulas silvestres a las 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 144 horas post inoculación (hpi) con *R. tropici* simultáneamente con las raíces no-inoculadas. Las muestras colectadas en cada tiempo se evaluaron mediante RT-qPCR utilizando oligos específicos para *PvPI3K* (**Tabla 6**). Los niveles de transcripción de *PvPI3K* de las raíces después de la inoculación con *R. tropici* no cambiaron hasta las 72 hpi comparadas con la no inoculadas (**Figura 23 B**). Sin embargo, a las 96 hpi, el nivel de transcripción de *PvPI3K* en las raíces inoculadas ($1,41 \pm 0,24$) fue tres veces más alto que en las raíces no inoculadas ($0,49 \pm 0,073$). El nivel de expresión más alto se observó a las 144 hpi ($3,99 \pm 0,56$) con un valor de 2,5 veces más alto en comparación con las raíces no inoculadas ($1,57 \pm 0,23$). El mismo resultado fue reportado con la expresión de PI3K en raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* que se incrementó significativamente a partir de las 72 hpi (Peleg-Grossman *et al.*, 2007). Para corroborar que la inoculación de las raíces fue efectiva, se monitoreó el gen de la nodulina temprana *ENOD40* el cual se induce por *Rhizobium* para iniciación del primordio de nódulo durante su desarrollo, en el periciclo de la raíz y en la división de las células corticales (Compaan *et al.*, 2001; Crespi *et al.*, 1999). Se midieron los niveles de transcrito de *ENOD40* como un marcador de la nodulación a las 72 hpi y se encontró que en las raíces inoculadas fueron significativamente más altos (10,4 veces) que en las raíces no-inoculadas (**Figura 23 C**). Los niveles de transcritos de *PvPI3K* también fueron evaluados.

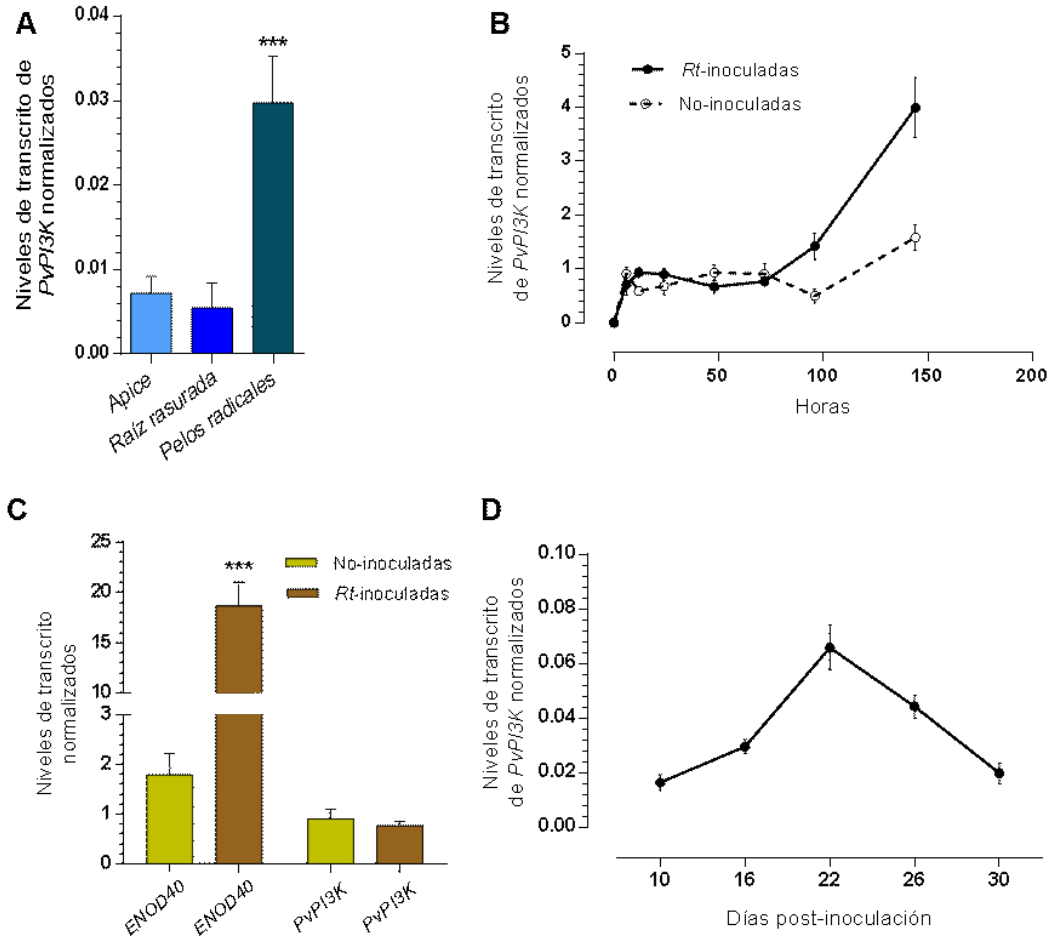


Figura 23. Niveles de transcrito de PvPI3K en las raíces de *Phaseolus vulgaris* tipo salvaje.

(A) Los niveles del transcrito de *PI3K* fueron cuantificados en raíces mediante análisis de RT-qPCR. En los pelos radicales, en el ápice de la raíz y en las raíces rasuradas de *P. vulgaris* de dos días de edad. Las barras representan la media y la desviación estándar (\pm DS) de dos experimentos ($n = 2$ de un conjunto de 150 raíces de plántulas tratadas por separado del ápice y las raíces rasuradas).

(B) Niveles de transcrito de *PvPI3K* en tiempos tempranos de la nodulación. Las raíces fueron inoculadas (línea negra) con *R. tropici* CIAT899 o no-inoculadas (línea de puntos) y la expresión de *PvPI3K* se determinó a las 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 144 hpi. Las barras representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos ($n = 3$ de un conjunto de 10 raíces).

Para **(A)** y **(B)** el análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de una vía seguida por la prueba de Tukey (***) $P < 0,0001$. **(C)** Niveles de transcrito del marcador de nodulación *PvENOD40* y de *PvPI3K* en las raíces no inoculadas e inoculadas a 72 hpi con *R. tropici* CIAT899 (*Rt*-inoculadas). Las barras representan la media (\pm DS) de tres experimentos ($n = 3$ de un conjunto de 10 raíces). No se encontró diferencia significativa para los niveles de transcrito de *PvPI3K* después de la inoculación. Las diferencias estadísticamente significativas para *ENOD40* fueron confirmadas por la prueba *t*-Student (***) $P < 0,001$.

Figura 23. Continuación. (D) Niveles de transcrito de *PvPI3K* en tiempos tardíos de la nodulación. El RNA fue extraído de los nódulos cosechados de las raíces de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* CIAT899 a los 10, 16, 22, 26 y 30 dpi. Las barras representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos ($n = 2$ de un conjunto de 10 raíces). Para **(C)** y **(D)** las diferencias estadísticamente significativas fueron confirmadas por la prueba *t*-Student. Para **(A)** a **(D)** los niveles de transcrito fueron cuantificados por RT-qPCR y calculados como se describe en **II.6.7.2**. La normalización se hizo utilizando los niveles del EF1 α como gen de referencia.

por RT-qPCR durante las etapas de la organogénesis del nódulo a 10, 16, 22, 26 y 30 días post inoculación. Se observó un pico de niveles más altos en los nódulos maduros alrededor de los 20 dpi en comparación con los primordios de nódulo (10 dpi) y los nódulos senescentes (30 dpi) (**Figura 22 D**). Estos resultados coinciden con los reportados en las leguminosas *Glycine max* y *M. truncatula*, donde los niveles de transcripción de PI3K aumentan durante la interacción simbiótica. ([Hong y Verma, 1994](#); [Hernandez et al., 2004](#); [Roux et al., 2014](#)).

IV.3 Localización de transcritos de *PvPI3K in situ* en nódulos de *P. vulgaris*

Con el propósito de obtener un anticuerpo anti-PI3K para estudiar y localizar la proteína en los nódulos de poroto, se hizo un anticuerpo dirigido hacia un fragmento de la proteína recombinante GST-PI3K (GST, glutatión *s*-transferasa). Cuando se probaron extractos proteicos de nódulos en ensayos de tipo *western-blot*, se detectaron dos bandas (de aproximadamente 60 y 30 kD) en lugar de una sola banda del tamaño esperado para una proteína de 97 kD ([datos no mostrados](#)). Probablemente no se detectó porque la vida media de PI3K es corta o porque tiene un sitio de procesamiento (PEST) que puede dar los fragmentos observados (**Figura 15**). En lugar de detectar la proteína, se decidió detectar el transcrito en nódulos de poroto por medio de RT-PCR *in situ*. Para obtener los cortes de tejido apropiados para el ensayo, se colectaron nódulos silvestres de poroto de 20 dpi que se procesaron para el análisis microscópico. Se fijaron y se deshidrataron para embeberlos en parafina. Después se hicieron cortes transversales finos de los nódulos y se colocaron en portaobjetos como se describe en **II.6.5**. Los nódulos se rehidrataron para llevar a cabo la reacción con un aditamento especial directamente en los tejidos de acuerdo al protocolo de [Ruíz Medrano et al., 1999](#). La reacción de RT-PCR *in situ* se hizo en dos etapas con oligos específicos para amplificar 0,86 kb de PI3K (**Tabla 6**) incorporando un nucleótido fluorescente en un termociclador para reacciones *in situ*. Al final de la reacción, se añadió etanol, se lavaron los tejidos y se montaron para su análisis en el microscopio confocal. Como se puede apreciar en la **Figura 24**, en los nódulos control (**Figura 24 A1-A3**) sin polimerasa *rTth*, no se detectó señal fluorescente específica. En nódulos con

polimerasa se encontró señal fluorescente (en rojo) en las células infectadas, en el tejido vascular, en las células del córtex, rodeando a los amiloplastos y en el núcleo (**Figura 24 B1-B3 y C1-C3**).

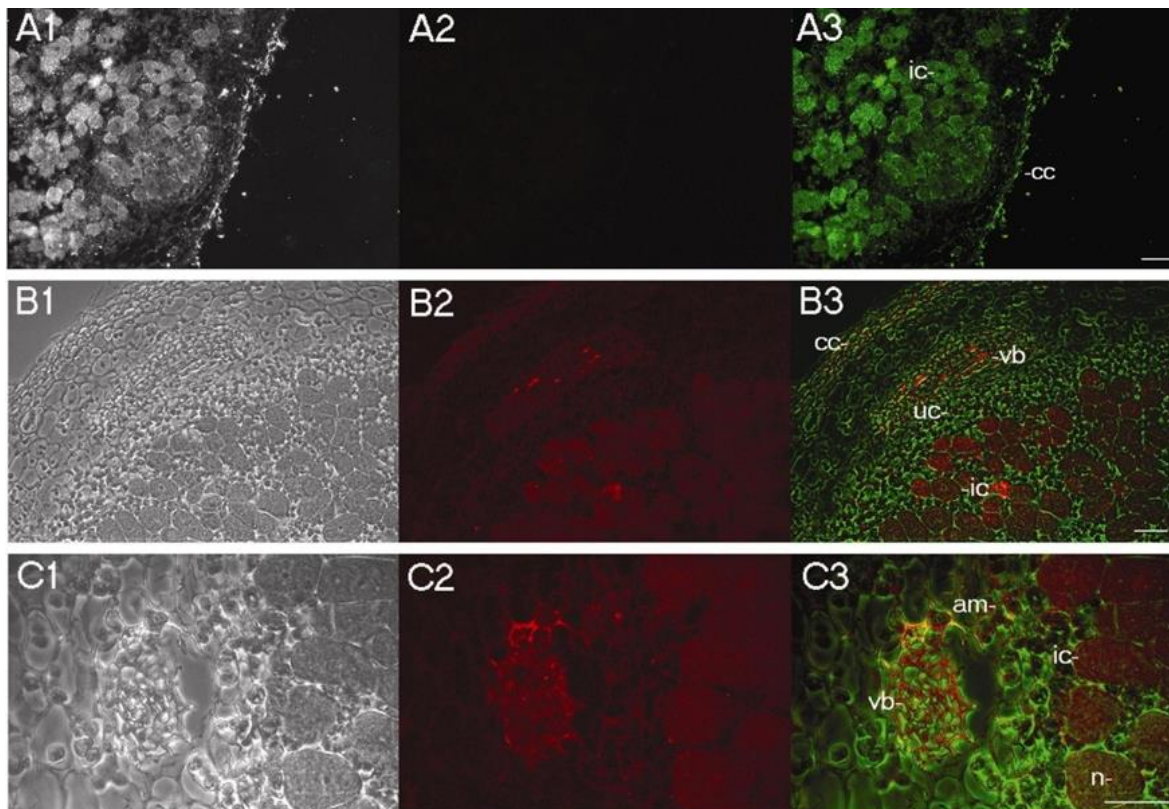


Figura 24. Localización de transcritos PvPI3K en nódulos de *Phaseolus vulgaris*.

Micrografías de secciones transversales de nódulos silvestres de *P. vulgaris* procesados por RT-PCR *in situ* para amplificar transcritos de PI3K con polimerasa *rTth* y *fluorolink* Cy5-dUTP (en rojo). Serie (**A1-A3**) muestras de tejido control (sin *rTth*) y series (**B1-B3**) y (**C1-C3**) experimentales (con polimerasa *rTth*).

(**A1**) (**B1**) y (**C1**) Imágenes de contraste de fase de los nódulos silvestres de 20 dpi.

(**A2**) (**B2**) y (**C2**) Se puede observar una señal fluorescente específica de la amplificación en rojo.

(**A3**) (**B3**) y (**C3**) Muestran la fusión de imágenes en color verde artificial. Se puede observar la señal específica rojo fluorescente de DNA de PI3K sintetizado en: **cc**, células del córtex; **ic**, células infectadas; **uc**, células no infectadas; **am**, amiloplastos; **vb**, haz vascular; y **n**, núcleo. Barra= 100 μ m en series (**A1-A3**) y (**B1-B3**). Barra= 50 μ m en serie (**C1-C3**).

IV. 4 *PvPI3K* se expresa en pelos radicales de *P. vulgaris*

Para determinar la expresión diferencial de *PvPI3K* en las raíces de poroto se utilizó una construcción con la secuencia del promotor de *PvPI3K* (*proPvPI3K*, de aproximadamente 1.070 pb corriente arriba (en relación al ATG) fusionada con el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) seguido de la β -glucuronidasa (GUS) (*proPvPI3K:GFP-GUS*) en el vector pBGWFS7,0. Esta construcción se obtuvo del trabajo de tesis de Cruz (2014). El promotor contiene secuencias consenso características que se activan en células infectadas de nódulos (NODCON1 / NODCON2) y otros elementos cis-reguladores que se encuentran en los promotores de los genes expresados en el xilema, durante el choque de calor, la respuesta al estrés salino, a patógenos y en el promotor de *leghemoglobina A*.

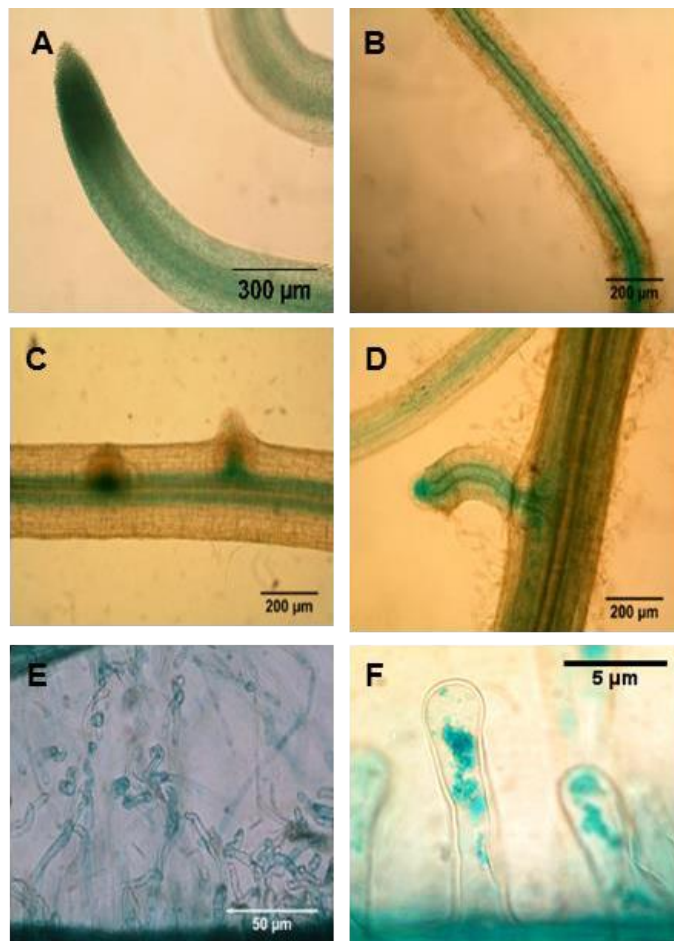


Figura 25. Actividad del promotor *proPvPI3K:GFP-GUS* en las raíces de *Phaseolus vulgaris*.

(A) a (F) La actividad de GUS (color azul) de las raíces transgénicas. (A) se detectó en la punta de la raíz; (B) en el tejido vascular; (C) en la base de emergencia de los primordios de raíces laterales; (D) en la punta y tejido vascular de raíces laterales; (E) en la punta y a lo largo de los pelos

Figura 25. Continuación. radicales y (F) a lo largo de los pelos radicales. Barra= 300 μm en (A); 200 μm en (B) a (D) y 50 μm en (E) y 5 μm en (F).

La expresión de esta construcción (*proPvPI3K:GFP-GUS*) se llevó a cabo a través de la transformación de poroto mediada por *Agrobacterium rhizogenes* K599 (ver sección II.9). De acuerdo a las condiciones y los tiempos indicados, se colectaron las raíces transgénicas y se hizo la histoquímica de acuerdo a Jefferson *et al.*, (1987). Se encontró la actividad de GUS localizada en las zonas meristemáticas de la raíz, en la punta de la raíz (Figura 25 A); en el tejido vascular a lo largo del zona de elongación de la raíz (Figura 25 B); en la base de emergencia de las raíces laterales (Figura 25 C); en la punta y tejido vascular de raíces laterales (Figura 25 D) y en los pelos radicales (Figura 25 E y F), mientras que en raíces control con el vector vacío, no se encontró actividad de GUS (datos no mostrados). La actividad del promotor de PvPI3K se observó en todos los tejidos de la raíz, incluyendo las puntas y el citoplasma de los pelos radicales de poroto, igual que el promotor (*AtVPS34*) de *Arabidopsis* que se ha detectado prácticamente en toda la planta.

IV.5 La actividad del promotor *proPvPI3K:GFP-GUS* durante la simbiosis nodular de *P. vulgaris*

Para analizar la expresión del promotor de PI3K durante la simbiosis nodular en poroto, se llevó a cabo el ensayo histoquímico de actividad de la GUS en raíces transgénicas inoculadas con *R. tropici*. Las raíces mostraron una fuerte expresión de GUS (proveniente de la actividad de *proPvPI3K:GFP-GUS*) en la punta de la raíz (Figura 26 A); en los sitios de formación de primordios de nódulo (Figura 26 B) donde se localizan los pelos radicales infectados (Figura 26 C). Una fuerte expresión de GUS se observó en la zona central de infección de los nódulos maduros donde se localizan las células infectadas (Figura 26 D) y en el tejido vascular de nódulos senescentes (datos no mostrados). Mientras que en las raíces inoculadas con el control (vector vacío, pBGWFS7,0) y durante la organogénesis del nódulo no se encontró actividad de GUS.

La actividad del promotor de PvPI3K (*proPvPI3K:GFP-GUS*) se observó en tejidos similares tanto de raíces no inoculadas como en las inoculadas que la relacionan con emergencia de raíces laterales, tejido vascular, puntas de la raíz y en los pelos radicales que apuntan a la participación de PI3K en el crecimiento celular. Particularmente en las raíces inoculadas, la actividad se observó tanto en células infectadas con *Rhizobium* como los pelos radicales, las células del cortex que rodean el primordio de nódulo y las células infectadas de los nódulos maduros. Estos resultados coinciden con los tejidos donde se encontraron altos niveles de transcrito de PvPI3K, en los pelos radicales donde inicia la infección y en

nódulos maduros (18-20 dpi). En estos nódulos maduros se registró el pico de expresión de PI3K más alto y también se localizaron los transcritos *in situ* en las células infectadas de nódulos efectivos en la fijación de nitrógeno. El nivel de expresión de PI3K declinó en la senescencia donde la actividad del *proPvPI3K* se observó exclusivamente en haces vasculares.

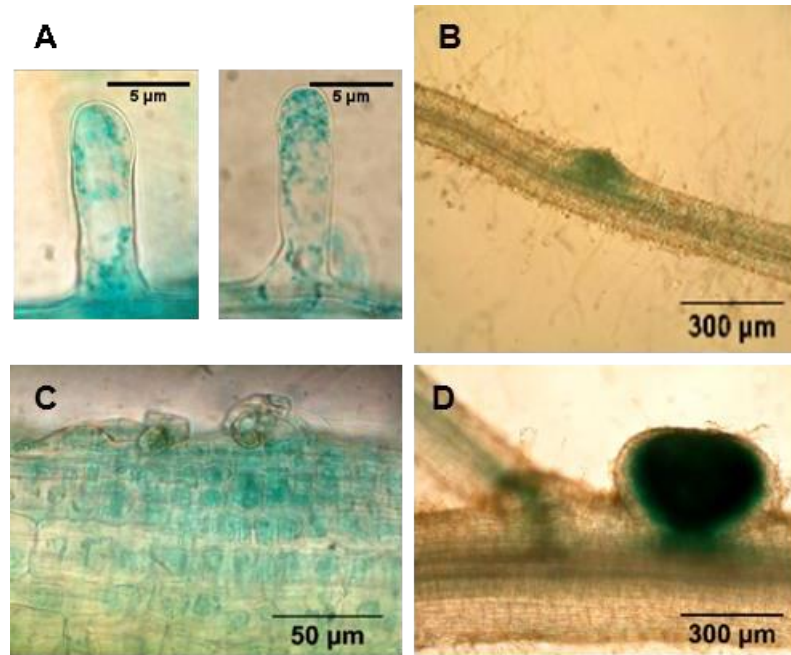


Figura 26. La actividad del promotor *proPvPI3K:GFP-GUS* durante la simbiosis

Las raíces que expresan el promotor de *PvPI3K* fueron inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899. Se muestra la actividad de GUS determinada por histoquímica en (A) la punta de los pelos radicales de raíces inoculadas; (B) en el primordio de nódulo; (C) en los pelos radicales infectados así como en las células adyacentes al sitio de infección y en (D) la zona central de infección de nódulos maduros. Barras= 5 µm en (A); 300 µm en (B) y (D); y 50 µm en (C).

IV.6 La pérdida de la función de *PvPI3K* afecta el crecimiento de pelos radicales

Para comprender mejor el papel de PI3K en *P. vulgaris* se utilizó un RNA interferente (RNAi) para reducir la expresión de *PvPI3K* en plantas compuestas de poroto. La secuencia blanco se clonó en el vector pTDT-DC-RNAi para producir el pTDT-*PvPI3K*-RNAi (o *PvPI3K*-RNAi). La construcción se transformó en *A. rhizogenes* K599 para obtener raíces pilosas como se describe en II.9. Las raíces transgénicas individuales que expresan el *PvPI3K*-RNAi específico con intensa fluorescencia fueron seleccionadas para cuantificar los niveles de transcrito de *PvPI3K* (Figura 27 A y B). También se seleccionaron las raíces control

transformadas con pTDT-Sac-RNAi (o Sac-RNAi) que expresan un RNA irrelevante y también la proteína roja fluorescente (*tdTomato*). Las raíces no fluorescentes se descartaron del callo de infección. Se encontró por RT-qPCR una reducción de los niveles de transcrito *PvPI3K* de aproximadamente un 60% en raíces *PvPI3K*-RNAi respecto a los encontrados en las raíces transgénicas control (**Figura 27 A**). A pesar de la reducción en los niveles de transcrito de *PvPI3K*, se observó en todo el sistema de la raíz un fenotipo normal en cuanto a la longitud de la raíz principal y la arquitectura de la raíz. Pero cuando se observaron al microscopio, aparentemente tenían una menor proporción de pelos radicales. Esto sugería que el déficit de PI3K podría tener una relación directa sobre el tamaño de los pelos de la raíz. Posteriormente las raíces transgénicas de poroto fueron inoculadas con *Rhizobium* para analizar el fenotipo simbiótico de raíces control (**Figura 27 C y D**) y silenciadas (**Figura 27 E y F**).

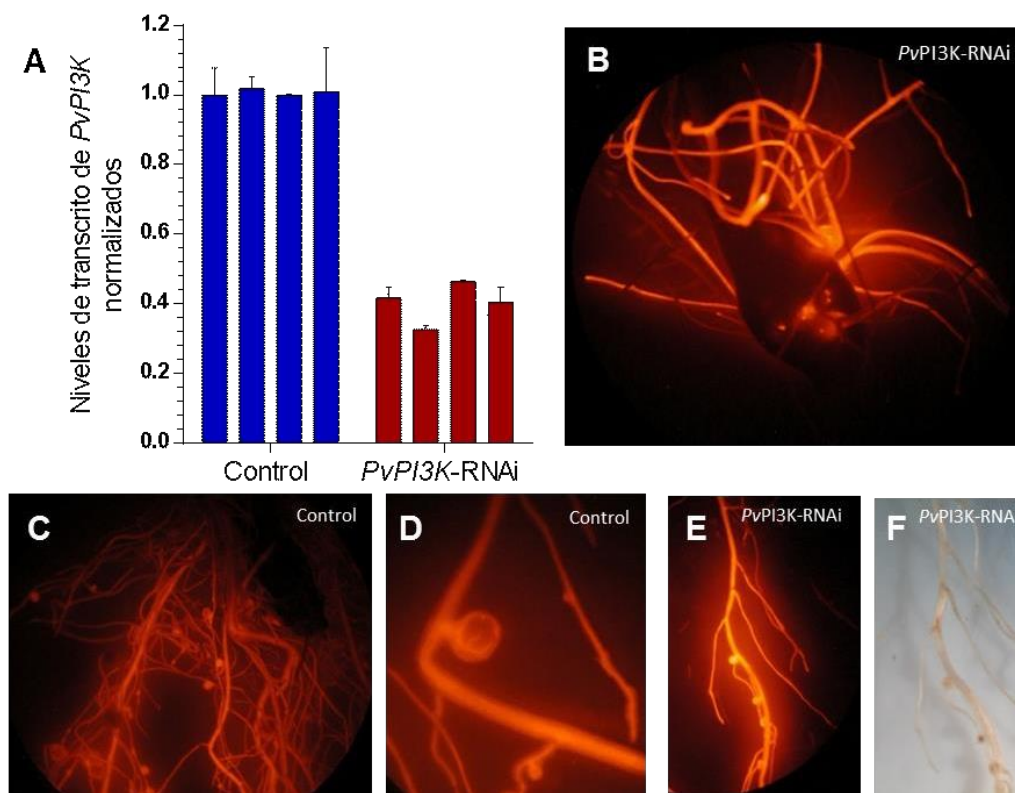


Figura 27. Niveles de transcrito de raíces silenciadas en *PvPI3K*

(A) Niveles de transcrito de cuatro raíces individuales (*PvPI3K*-RNAi) comparadas con cuatro raíces control (*Sac*-RNAi). Los niveles de transcrito fueron cuantificados por RT-qPCR y los valores normalizados se calcularon con base a los niveles del gen de referencia *EF1 α* como se describe en II.6.7. Cada muestra se ensayó por triplicado y el promedio se graficó como un evento

Figura 27. Continuación. independiente. Las barras de error indican la \pm DS. **(B)** raíces fluorescentes (tdTomate) a doce días post infección con *A. rhizogenes* K599 albergando el vector pTDT-PvPI3K-RNAi. **(C)** Raíces de 20 dpi con *R. tropici* CIAT899 (*Sac*-RNAi); **(D)** acercamiento de nódulo control; **(E)** raíz nodulada *PvPI3K*-RNAi y **(F)** la misma raíz en luz blanca. Fotomicrografías tomadas en el Microscopio de epifluorescencia Olympus MVX10.

Para observar y analizar a detalle los pelos radicales, se seleccionaron las raíces transgénicas fluorescentes, se cortaron y se sometieron a un aclaramiento por un método basado en yoduro de sodio (NaI) que permite almacenar las muestras antes del análisis y reduce significativamente el trabajo de preparar los tejidos (Dubrovsky *et al.*, 2009). Las raíces se montaron en solución de aclaración y se observaron al menos una hora después de la preparación de la muestra en un microscopio invertido con óptica Nomarski u Óptica de Contraste interdiferencial (DIC). Este tipo de microscopía se caracteriza porque tiene una buena resolución y contraste que permite obtener imágenes brillantes sin necesidad de tinción. Como no se conoce la longitud máxima de pelos radicales de poroto silvestre y los datos que encontramos reportados en la literatura son para raíces obtenidas con el transgene GUS-RNAi de una longitud aproximada de $250 \pm 60 \mu\text{m}$ (Blanco *et al.*, 2009). Se determinó la longitud más larga de los pelos radicales de las raíces transgénicas control (*Sac*-RNAi) en poroto con un valor de $402 \pm 60 \mu\text{m}$ en las condiciones de crecimiento antes descritas. Este valor se utilizó como parámetro para las mediciones de longitud de los pelos radicales. Después se definieron tres fases discretas sucesivas de acuerdo al crecimiento de los pelos radicales en *Arabidopsis* descrito por Dolan *et al.*, (1994) que son: la emergencia o aparición de pequeñas protuberancias, la presencia de pelos de la raíz de crecimiento apical lento y aquellos de crecimiento rápido. Con base a estas fases de crecimiento, los pelos de raíz transgénica de *P. vulgaris* se distribuyeron en tres grupos: pelos emergentes de la raíz, pelos radicales cortos de longitud menor de $130 \mu\text{m}$ (equivalente a un tercio o menos del valor máximo estimado) y pelos radicales largos de longitud mayor de $130 \mu\text{m}$. Los pelos radicales cortos pueden incluir células con una fase de crecimiento apical lento, mientras que los pelos radicales largos están haciendo la transición a una tasa creciente de crecimiento apical (**Figura 28 A, B, y C**). Para determinar el efecto del silenciamiento de *PvPI3K* (60 %) (**Figura 27 A**) en los pelos radicales, se escogieron zonas representativas de las raíces que presentaron una densidad similar de pelos radicales. Se analizó la distribución de pelos radicales (por óptica Nomarski) y se contó el porcentaje de acuerdo a los campos visuales por milímetro a lo largo de la raíz pilosa. Se registraron imágenes digitales de 15-16 raíces transgénicas *PvPI3K*-RNAi y de raíces control (*Sac*-RNAi) de 230 y 290 campos analizados, respectivamente. Si bien no se encontraron diferencias cuando se comparó el porcentaje de pelos radicales cortos

observados entre las raíces *PvPI3K-RNAi* y las raíces control (*Sac-RNAi*). Se encontraron más pelos de tipo emergente en *PvPI3K-RNAi* ($28,86\% \pm 4,69$) que en el control *Sac-RNAi* ($15,37\% \pm 2,31$) y se encontró una disminución de alrededor de dos veces el porcentaje de pelos radicales largos ($14,36\% \pm 2,60$) en las raíces con pérdida de la función *PvPI3K* respecto a las raíces transgénicas control *Sac-RNAi* ($33,12\% \pm 4,36$) (**Figura 28 D**).

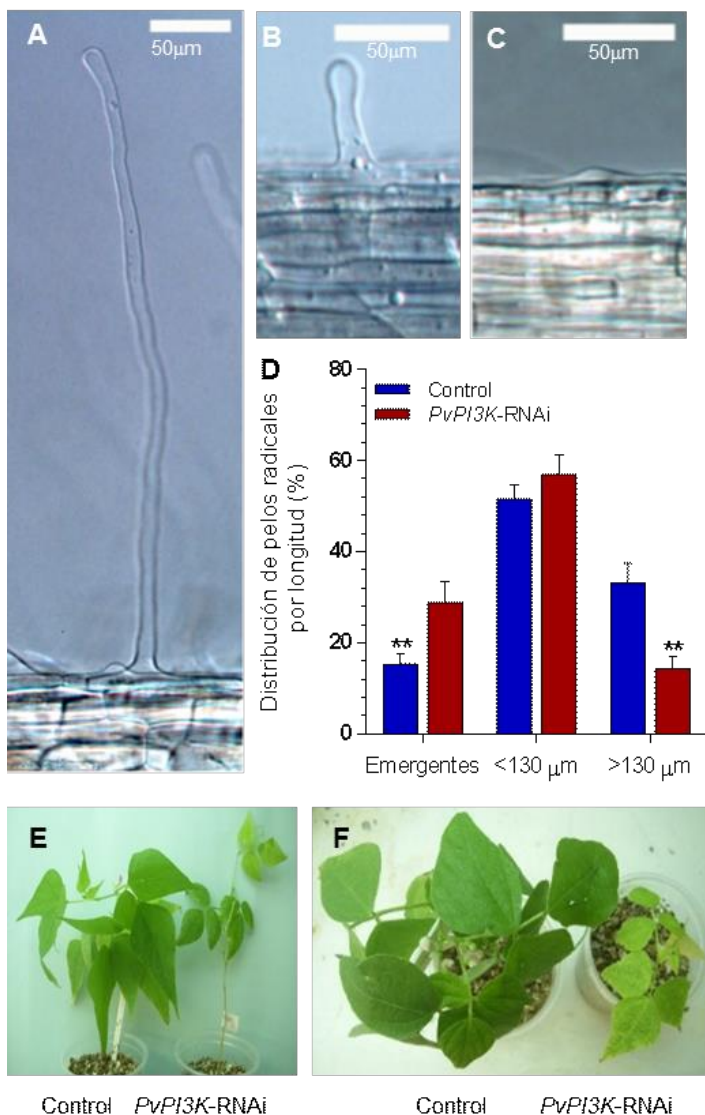


Figura 28. La pérdida de la función de *PvPI3K* afecta el crecimiento de pelos radicales y el desarrollo de las plantas compuestas. (A) (B) y (C) Imágenes representativas de pelos radicales de *P. vulgaris* de diferente longitud, como se describe en la sección II.10. **(A)** Pelos radicales largos >130 μm, **(B)** cortos <130 μm **(C)** y la protuberancia o emergencia del pelo radical. Barra= 50 μm. **(D)** La distribución de la longitud de pelos radicales a los 12 días de edad en raíces transgénicas del control (*Sac-RNAi*) y *PvPI3K-RNAi*, se presentan como porcentaje (%), donde el 100% es la suma de

Figura 28. Continuación. todos los pelos contados de la raíz. Las barras son el valor promedio (%) de las raíces transgénicas independientes (n= 16). Las barras son la media \pm error estándar (SEM). Las diferencias estadísticamente significativas fueron confirmados por la prueba *t*-Student con corrección de *Welch* (***P* <0,001). **(E)** y **(F)** Fenotipo de la parte aérea de las plantas compuestas control (*Sac*-RNAi) y con pérdida de la función *PvPI3K*.

Estos resultados reflejan un efecto del silenciamiento de *PvPI3K* en el crecimiento de los pelos radicales de poroto, a diferencia de plantas mutantes heterocigotas de *Arabidopsis* (con inserción de un T-DNA en *PI3K*; plantas GABI-418H02) que no difieren de las plantas silvestres en relación a la longitud de los pelos radicales. La longitud reportada de los pelos radicales para las plantas VPS34/VPS34 y VPS34/vps34, fue similar ($466,5 \pm 8,7 \mu\text{m}$ y $452,1 \pm 6,5 \mu\text{m}$, respectivamente) (Lee *et al.*, 2008a; Leshem *et al.*, 2007). Probablemente no se afectó el crecimiento de pelos radicales de *Arabidopsis* porque la mutación de *PI3K* está en el dominio C2 (de unión a membrana) y no afectó su actividad, pero sí el crecimiento de las plantas, sugiriendo que el crecimiento polar es dependiente del *PI3P*. Esto se comprobó en *Arabidopsis*, con el uso del inhibidor específico de *PI3K*, el LY294002, el cual redujo severamente el crecimiento de los pelos radicales en las plantas tratadas comparadas con las que no fueron tratadas. Esta disminución no afectó la forma ni el número de los pelos emergentes o el número total de pelos radicales en altas concentraciones del inhibidor.

IV.7 *PvPI3K* está involucrada en el desarrollo de plantas compuestas de poroto

Sorprendentemente, en plantas compuestas con pérdida de la función de *PvPI3K* inoculadas con *Rhizobium* se observó un crecimiento disminuido en la parte aérea comparadas con las plantas control (*Sac*-RNAi) (**Figura 28 E y F; Figura 29 A**). Para corroborar si los cambios observados en el desarrollo de las hojas de las plantas se debían al efecto del *PvPI3K*-RNAi o al déficit de nitrógeno al que se exponen (para favorecer la simbiosis), las plantas compuestas con déficit de nitrógeno (-N) se complementaron con nitrógeno para ver si se restablecía el crecimiento de las hojas. Después de 10-12 días de tratamiento con riego con solución con 10 mM de nitrógeno (+N), las plantas compuestas con pérdida de la función de *PvPI3K* conservaron el fenotipo de desarrollo en la parte aérea comparadas con las plantas compuestas control (*Sac*-RNAi) (**Figura 29 B**). En consecuencia también se encontró una disminución en el tamaño de las vainas en estas plantas compuestas *PvPI3K*-RNAi comparadas con las plantas control (**Figura 29 C**). Una característica de las plantas compuestas de poroto obtenidas con *A. rhizogenes* K599 es que tienen raíces transgénicas con alta eficiencia de transformación, que nodulan en presencia de rizobio, mientras que el tejido aéreo es silvestre (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006, 2007). En este caso las plantas compuestas fueron generadas con un RNAi bajo el control del promotor fuerte CaMV 35S; éste se encontró activo en las raíces y durante el

desarrollo de los nódulos. Probablemente el efecto de silenciamiento de PI3K en la parte aérea se debe a un transporte sistémico que sería muy interesante analizar o debido a un efecto indirecto a través de otra molécula que esté involucrada en el crecimiento de las hojas.

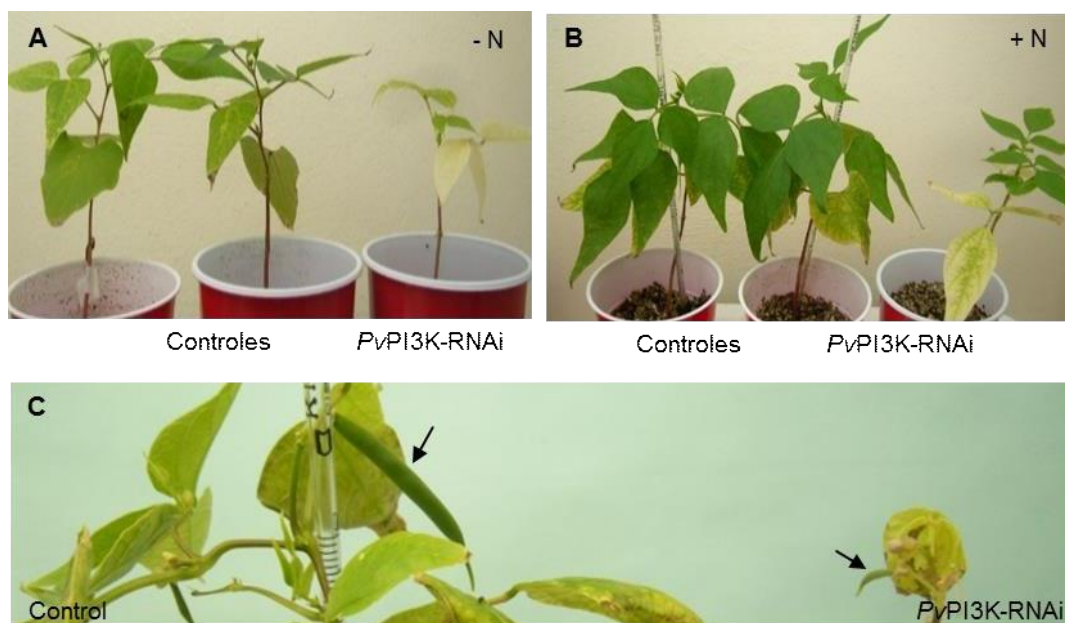


Figura 29. La pérdida de la función de *PvPI3K* afecta el desarrollo de las plantas compuestas.

(A) Fenotipo de la parte aérea de plantas compuestas control (*Sac*-RNAi) y con pérdida de la función (*PvPI3K*-RNAi) con déficit de nitrógeno (-N). (B) Las mismas plantas compuestas después de ser complementadas con nitrógeno (+N) bajo la forma de KNO_3 10 mM. (C) Detalle de las vainas (n= 16 plantas).

IV.8 *PvPI3K*-RNAi afecta el funcionamiento de las hojas en las plantas compuestas

Para conocer cuánta diferencia había en el crecimiento entre las hojas de las plantas compuestas control (*Sac*-RNAi) comparada con las plantas *PvPI3K*-RNAi, se cuantificó el área de las hojas del segundo trifolio de las plantas compuestas. Se encontró una disminución de alrededor de cuatro veces el área en hojas *PvPI3K*-RNAi, comparadas con las hojas de plantas compuestas control (*Sac*-RNAi) (Figura 30 A y B). Para ver si la diferencia en el tamaño de las hojas tenía un efecto en el tejido de las hojas, se observaron al microscopio las hojas de plantas compuestas control (*Sac*-RNAi) en las cuales se observó el tejido normal (Figura 30 C), mientras que en las plantas *PvPI3K*-RNAi

(Figura 30 D y E) se apreciaron cúmulos de cloroplastos rodeando el tejido vascular de las hojas. La hipótesis era que la acumulación de cloroplastos debería tener un efecto positivo en la fotosíntesis, para ello se midió la eficiencia fotosintética con el equipo y el protocolo desarrollado por el Dr. Retto Strasser de la Universidad de Génova (sección II.12). Este método se llevó a cabo monitoreando *in vivo* el funcionamiento fotosintético en los trifolios de 16 plantas compuestas sin alterar los tejidos de las hojas. En las pequeñas hojas con pérdida de la función de PI3K (*PvPI3K-RNAi*), se encontró un incremento de alrededor del 10 % en la densidad de cloroplastos (C/A, 116,22% \pm 0,01), así como la actividad fotosintética (AF, 112,6% \pm 0,012) y el número de cloroplastos (NC, 110,82% \pm 0,0059) en comparación con las hojas de plantas compuestas control (*Sac-RNAi*) que son de mayor tamaño (Figura 30 F). El resultado mostró un incremento de la fotosíntesis en las hojas pequeñas de las plantas *PvPI3K-RNAi*, esto sugiere que la reducción del crecimiento puede producir un efecto de aumento de la concentración de cloroplastos. Porque la tasa de replicación de los cloroplastos no se debe haber reducido tanto como el tamaño celular y eso le permite sobrevivir.

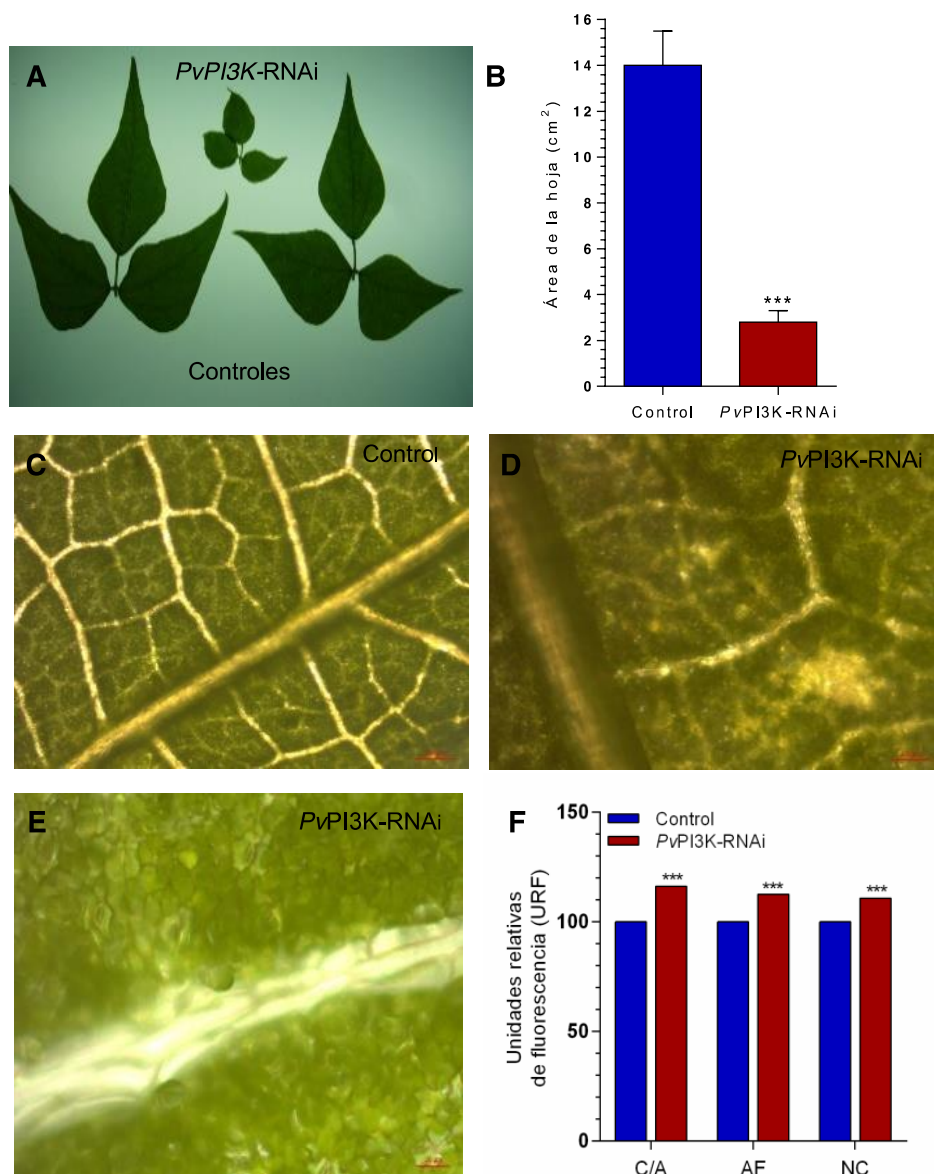


Figura 30. La pérdida de la función de PI3K incrementa el funcionamiento de las hojas

(A) Fenotipo de las hojas y (B) área estimada en plantas compuestas control (*Sac-RNAi*) y con pérdida de la función de *PvPI3K*. (C) Microfotografías de hojas de plantas compuestas control (*Sac-RNAi*) y (D) de hojas *PvPI3K-RNAi* con objetivo 5x. (E) Amplificación 20x de la microfotografía (D). Barra= 100 μ m en (C) y (D); Barra: 50 μ m en (E). (F) Cuantificación de la eficiencia fotosintética estimada como unidades relativas de fluorescencia (URF). C/A, Densidad de cloroplastos por área; AF, Actividad fotosintética y NC, Número de cloroplastos. 6 lecturas/hoja (n= 3 con 36 lecturas por planta). Las diferencias estadísticamente significativas fueron confirmadas por la prueba *t*-Student (***) $P < 0,005$).

IV.9 La pérdida de la función de *PvPI3K* contrarresta la respuesta temprana de infección con *R. tropici*

Para monitorear el fenotipo de los pelos radicales de las raíces silenciadas *PvPI3K* de poroto, se analizó el enrulado del pelo radical como la respuesta temprana típica de la interacción específica de la simbiosis (**Figura 31 A**). Las raíces transgénicas (TDT, rojo fluorescente) con pérdida de función de *PvPI3K* de aproximadamente 60% comparadas con las raíces control (*Sac*-RNAi), todas ellas inoculadas (**Figura 31 B**), fueron cortadas, aclaradas y analizadas como se describió en la sección II.10. Las raíces se observaron bajo el microscopio invertido utilizando la birrefringencia para cuantificar el número de pelos radicales enrulados, después de 72 hpi con *R. tropici*. Se encontró una disminución considerable en el enrulado de los pelos radicales (aproximadamente 14 veces) de raíces *PvPI3K*-RNAi comparadas con raíces control (*Sac*-RNAi), lo cual se observó principalmente en los pelos cortos (**Figura 31 E**). De acuerdo con lo reportado previamente para *P. vulgaris*, generalmente los pelos radicales cortos y gruesos son más susceptibles a la infección con *R. etli* ([van Spronsen et al., 2001](#)).

Otro de los eventos tempranos analizados además del enrulado del pelo radical, es la formación y avance del hilo de infección con *Rhizobium*. Para evaluar el crecimiento y la ramificación del hilo de infección en el pelo radical, se utilizó una cepa marcada con GFP, *R. tropici*-GFP (cedida por la [Biol. Olivia Santana](#) en nuestro laboratorio). La penetración de la bacteria en las primeras capas de células corticales se analizó en las células epidérmicas de las raíces transgénicas por microscopía confocal con barrido de láser (LSCM.) Se buscaron hilos de infección en raíces a los 12 dpi entre la zona de crecimiento y aproximadamente a tres centímetros de la emergencia de la raíz. En las raíces control (*Sac*-RNAi) se encontraron los típicos hilos de infección ramificados invadiendo las células del cortex interno (**Figura 31 C**). Mientras que en las raíces *PvPI3K*-RNAi, se encontró que el crecimiento de hilo de infección está detenido en la primera capa de las células epidérmicas inhibiendo su crecimiento y avance hacia las células corticales en división (**Figura 31 D**). Como se puede observar, en este caso no se afectó la división de las células del cortex externo donde se forma el primordio de nódulos determinados. Los eventos de infección con estas características, denominados hilos de infección abortados se cuantificaron en las raíces control (*Sac*-RNAi) donde el número de los hilos abortados fueron muy escasos ($0,125 \pm 0,033$) comparados con aquellos en las raíces *PvPI3K*-RNAi alcanzando hasta $6,43 \pm 1,82$ hilos abortados por raíz (**Figura 31 F**). Estos resultados demuestran que se requiere de *PvPI3K* en las respuestas tempranas a *R. tropici*, para el enrulado del pelo radical y el avance de la bacteria a través de hilos de infección hacia las células corticales de la raíz para tener una infección exitosa. Estos procesos también se reportaron suprimidos en los pelos radicales de raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S.*

meliloti y tratadas con los inhibidores de PI3K wortmanina y LY294002 sin afectar la expresión de la nodulina temprana ENOD12 que media la nodulación (Peleg-Grossman *et al.*, 2009).

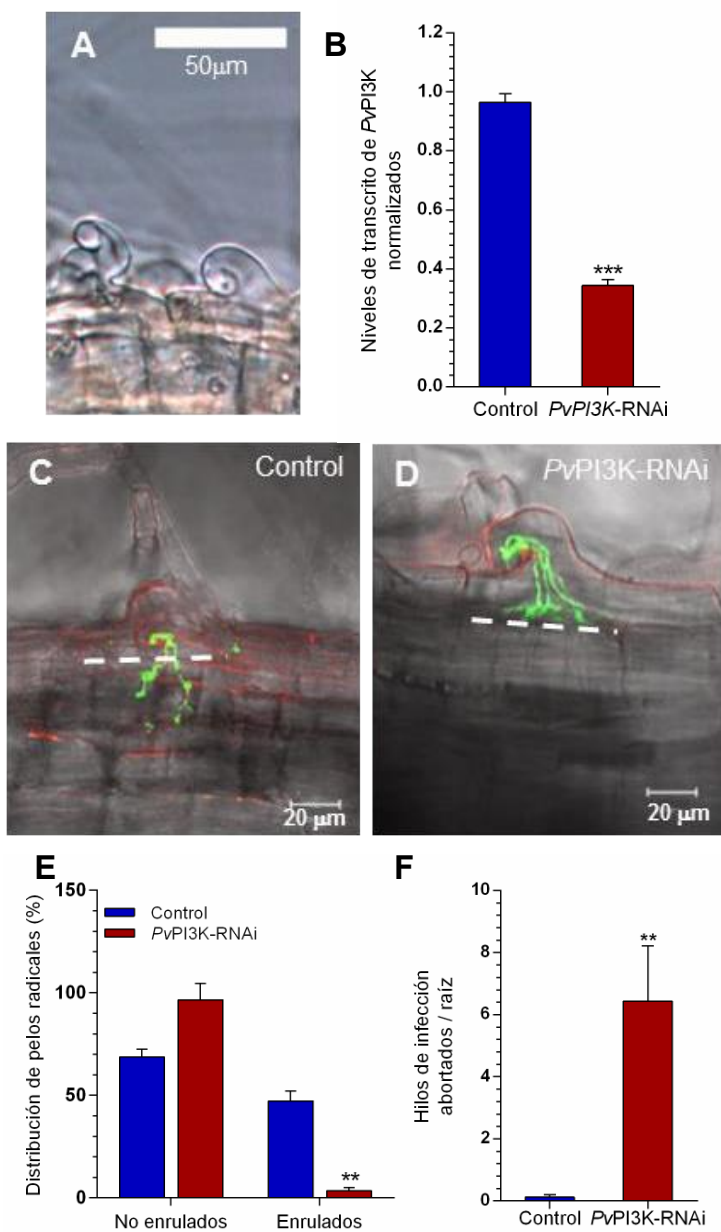


Figura 31. La pérdida de la función de PvPI3K contrarresta la respuesta temprana de infección con *R. tropici*.

(A) Imágenes representativas de pelos enrollados y en (C) y (D) de hilos de infección *in vivo* en las raíces de *P. vulgaris*. (A) Pelo enrollado observado normalmente después de la inoculación de la raíz con *R. tropici* CIAT899. Barra= 50 μm. (B) Los niveles de transcrito de *PvPI3K* de raíces transgénicas control (*Sac*-RNAi) y las que expresan *PvPI3K*-RNAi fueron cuantificadas por RT-qPCR.

Figura 31. Continuación. Los valores fueron normalizados a los del gen de referencia, el factor de elongación *EF1 α* como se describe en II.6.7.2. Las barras son la media \pm DS de cuatro réplicas biológicas y cada muestra se analizó por triplicado. El análisis estadístico se realizó con la prueba de *t*-Student (**P <0,004).

(C) Imagen de un hilo de infección formado en el pelo radical de las raíces control (*Sac*-RNAi). Las raíces transgénicas de *P. vulgaris* fueron inoculadas con *R. tropici* CIAT899 expresando GFP (*Rt*-GFP; verde). La progresión y ramificación del hilo de infección fue trazada basada en la fluorescencia de GFP. **(D)** Hilo de infección abortado en las raíces transgénicas *PvPI3K*-RNAi. Las líneas de puntos blancos indican el límite entre la epidermis de la raíz y la capa de células corticales adyacentes. El crecimiento del hilo de infección fue detenido en la base del pelo radical, antes de entrar a la capa de células en división adyacentes al sitio de infección. Este fenotipo de hilo de infección es referido como detenido o abortado. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Zeiss LSM-50, a partir de 34 secciones ópticas de 1,0 μ m para el control y 27 secciones ópticas de 1,0 μ m para las raíces *PvPI3K*-RNAi. Barras= 20 μ m. **(E)** Distribución de los pelos radicales no enrollados y enrollados en raíces control (*Sac*-RNAi) y *PvPI3K*-RNAi inoculadas con *R. tropici* CIAT899 colectadas a las 72 hpi. Se presenta como porcentaje (%), donde la suma de la cuenta total de pelos radicales enrollados y no enrollados es el 100%. Las barras son el valor promedio de 15-16 raíces transgénicas independientes. Las barras son la media \pm error estándar (SEM). Las diferencias estadísticamente significativas fueron confirmados por la prueba *t*-Student con corrección de *Welch* (**P <0,005). **(F)** Cuantificación de los hilos de infección abortados de raíces transgénicas de *PvPI3K*-RNAi y del control (*Sac*-RNAi). Las barras representan la media \pm DS de los hilos abortados por raíz, de raíces transgénicas independientes (n=16). La diferencia estadísticamente significativa se hizo con la prueba *t*-Student (**P <0,05).

CAPITULO V

**EFFECTOS DE PI3K EN LA INFECCIÓN, NODULACIÓN Y
FIJACIÓN DE NITRÓGENO**

V.1 La pérdida de la función de *PvPI3K* deteriora la nodulación en las plantas compuestas de poroto

Considerando que en las plantas de poroto con 60% de silenciamiento de *PvPI3K* se afectaron las etapas tempranas de la nodulación, se procedió a evaluar los efectos de la pérdida de función de *PvPI3K* en las etapas tardías donde se observó una disminución de la nodulación en las raíces (**Figura 32 A y B**). Para evaluar el grado de afectación, se cuantificó el número total de nódulos en las plantas compuestas *PvPI3K*-RNAi y en plantas control (*Sac*-RNAi) a los 22 dpi con *R. tropici*. En las raíces de las plantas control se encontraron alrededor de $172,40 \pm 68,50$ nódulos y $218,90 \pm 73,40$ primordios de nódulo por planta. En las plantas compuestas *PvPI3K*-RNAi, los números de los nódulos y los primordios por planta se redujeron drásticamente ($24,50 \pm 14,39$ y $40,66 \pm 18,34$, respectivamente) en comparación con los de plantas compuestas control (**Figura 32 C**). En resumen, el número de primordios se redujo cinco veces y el número de nódulos disminuyó casi siete veces en comparación con las plantas compuestas control (**Figura 32 C**). En las raíces transgénicas *PvPI3K*-RNAi deficientes en nodulación se encontraron pocos nódulos totalmente desarrollados comparados con los de las raíces control.

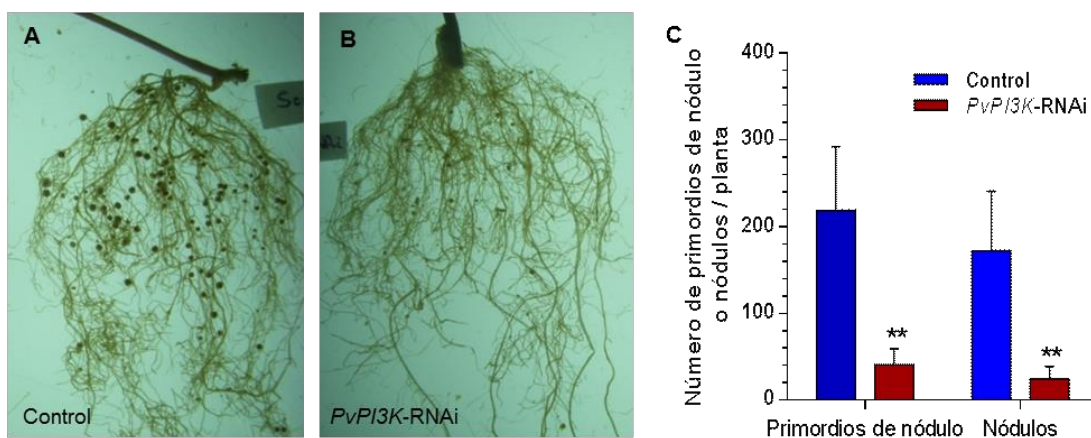


Figura 32. Fenotipo de nodulación en las raíces de poroto con la pérdida de la función de *PvPI3K*. (A) Raíces transgénicas inoculadas con *R. tropici* muestran numerosos nódulos en la raíz control (*Sac*-RNAi) comparada con (B) la cantidad de nódulos en raíces de plantas compuestas *PvPI3K*-RNAi. (C) El número de nódulos y de primordios de nódulos fueron cuantificados en plantas control (*Sac*-RNAi) y *PvPI3K*-RNAi. Las barras representan la media \pm DS de 10 raíces de plantas transgénicas a 22 dpi. La diferencia significativa fue determinada estadísticamente por la prueba *t*-Student (** $P < 0,003$ y ** $P < 0,05$, respectivamente).

V.2 *PvPI3K*-RNAi contrarresta la infección de nódulos de *P. vulgaris*

Para observar el fenotipo de los nódulos con pérdida de la función de *PvPI3K*, los tejidos en fresco se observaron en el microscopio confocal. Para esto, se colectaron muestras de las raíces *PvPI3K*-RNAi y de las control (*Sac*-RNAi) a los 17 dpi con *R. tropici*-GFP (*Rt*-GFP).

Se localizaron los bacteroides fluorescentes *Rt*-GFP en la zona central de los cortes de los nódulos control (*Sac*-RNAi) bien desarrollados (**Figura 33 A**), mientras que las raíces con pérdida de función de *Pv*PI3K exhibieron pequeños nódulos vacíos con ausencia de rizobios fluorescentes en la zona central de infección (**Figura 33 B**). Sin embargo, no se afectó la continuidad de las divisiones celulares corticales características de los primordios de nódulos determinados ([van Spronsen, et al., 2001](#)). En los nódulos vacíos las bacterias *R. tropici*-GFP se observaron rodeando los nódulos, encontrándose atrapadas dentro de la primera capa de células epidérmicas (**Figura 33 C**).

Para observar con más detalle los tejidos simbióticos, las muestras de los nódulos transgénicos colectados, se fijaron y se embebieron en resina LR-*White*. Para observarlos al microscopio, se cortaron en un ultra micrótopo, se colocaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina como se describe en **II.18**. Este colorante permitió observar las características de las estructuras morfológicas de los nódulos que se tornaron azules y permitió observar las células y los componentes tisulares. Los nódulos vacíos de las raíces con pérdida de función de *Pv*PI3K, mostraron un fenotipo pálido, con abundante tejido vascular y escasas células infectadas, las cuales se encontraron rodeadas de células no infectadas (**Figura 33 D, E y F**). También se observó que la distribución de las células infectadas y no infectadas, los amiloplastos, así como el tejido tipo vascular está desordenada (**Figura 33 E**). Las pocas células infectadas están cercanas a las células del cortex (**Figura 33 F**). A diferencia de esto, en los cortes de nódulos control (*Sac*-RNAi), se observó claramente la zona central de infección (**Figura 33 G**) con abundantes células infectadas, células no infectadas (**Figura 33 H**), rodeadas de haces vasculares bien definidos, amiloplastos, parénquima y células del cortex (**Figura 33 G, H e I**).

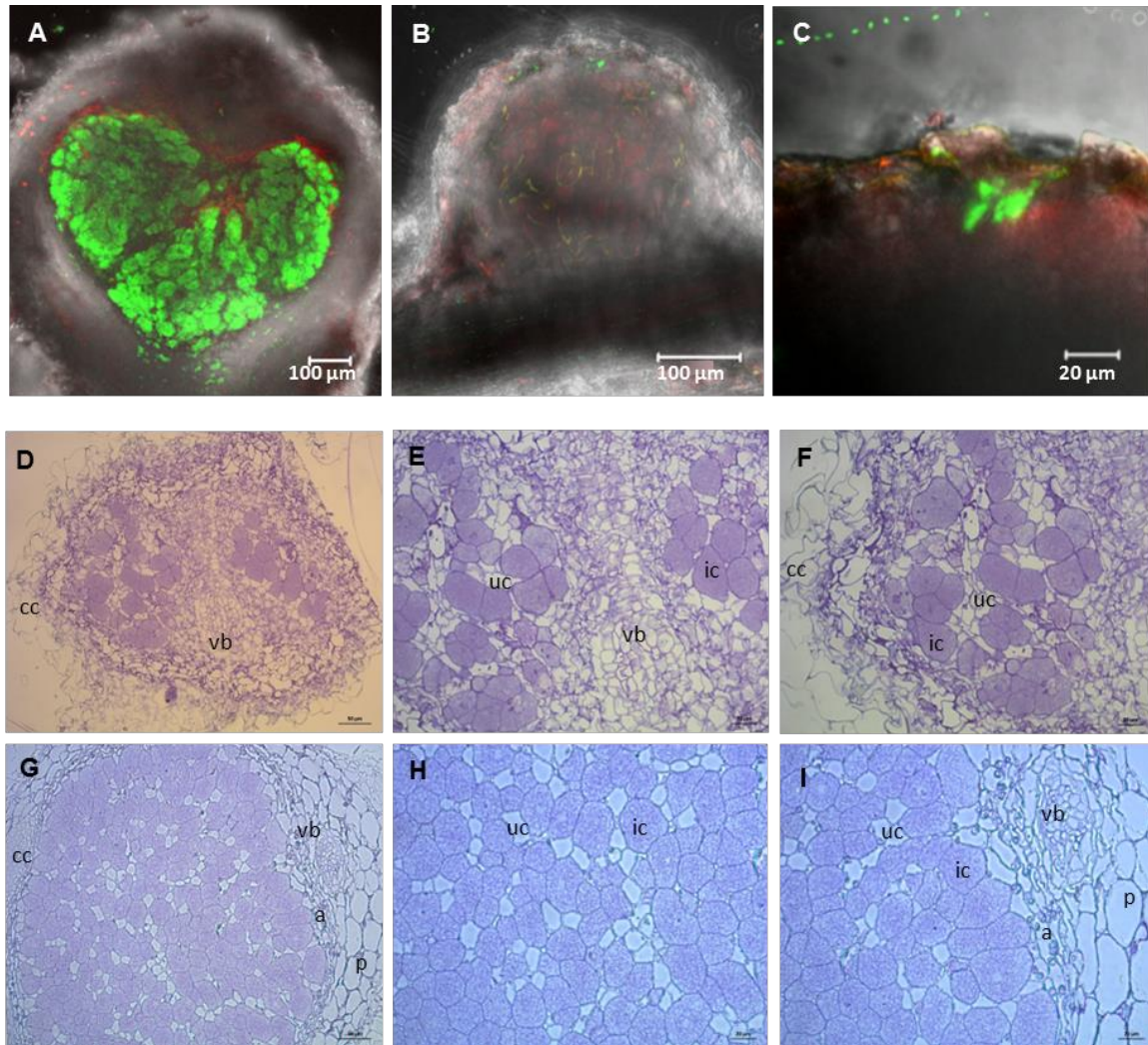


Figura 33. La pérdida de la función de PvPI3K contrarresta el desarrollo del nódulo de la raíz.

(A) (B) y (C) imágenes *in vivo* representativas de nódulos cosechados a 17 días pos inoculación de raíces transgénicas (A) del control *Sac*-RNAi (B) y (C) de *PvPI3K*-RNAi, fueron observadas por microscopía confocal de barrido por láser. Nódulos colectados a partir de raíces transgénicas infectadas con *R. tropici* CIAT899 que expresaban GFP, fueron seccionados a mano para determinar si el tejido central del nódulo contenía células infectadas (fluorescencia verde). (A) Nódulo control (*Sac*-RNAi) de la raíz transgénica que contiene células infectadas. (B) Nódulo pequeño, representativo de los observados en las raíces transgénicas *PvPI3K*-RNAi. Las células infectadas no se detectaron en el tejido central de estos nódulos. (C) Ampliación (63x) de un hilo de infección abortado en la periferia del nódulo mostrado en (B). Las imágenes fueron tomadas *in vivo* utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta; en (A) con 18 secciones ópticas cada una de 18,0 μm para el nódulo control (*Sac*-RNAi, aumento 10x); (B) en el nódulo *PvPI3K*-RNAi se hicieron 12 secciones ópticas cada una de 10 μm (amplificación 20x) y en (C) 29 secciones ópticas cada una de 1,0 μm (aumento 63x). Barra= 100 μm en (A) y (B). Barra= 20 μm en (C).

Figura 33. Continuación. Análisis histológico de nódulos transgénicos de *P. vulgaris*. Las micrografías muestran la organización y la morfología celular de nódulos colectados de raíces a 20 días postinoculación con *R. tropici*. (D) (E) y (F) Tejidos de nódulos con pérdida de la función de PI3K. (G) (H) e (I) Tejidos de nódulos control (*Sac*-RNAi) de plantas compuestas. Las muestras fueron teñidas con azul de toluidina. cc, células del cortex; ic, células infectadas; uc, células no infectadas; a, amiloplastos; vb, tejido vascular y p, parénquima. Barra= 50 μm en (D) y (G); Barra=20 μm en (E) (F) (H) e (I).

V.3 La pérdida de la función de *PvPI3K* daña la fijación de nitrógeno de plantas compuestas de poroto

Con el propósito de evaluar el funcionamiento de los pequeños nódulos deteriorados que se formaron en las raíces con pérdida de la función de PI3K, se determinó la fijación de nitrógeno con un ensayo de reducción de acetileno de acuerdo al método de Vessey, (1994). Se utilizaron para el ensayo plantas compuestas control (*Sac*-RNAi) y plantas que expresan la construcción *PvPI3K*-RNAi (Figura 34). Los resultados muestran que la fijación de nitrógeno en nódulos *PvPI3K*-RNAi se redujo considerablemente comparada con la de los nódulos control ($10,28 \pm 2,37$ vs. $67,20 \pm 10,39$ μmol de etileno/h/g de peso seco de nódulos). Como era de esperar, el fenotipo de silenciamiento en la expresión de *PI3K* tiene un efecto negativo sobre la fijación de nitrógeno de la planta.

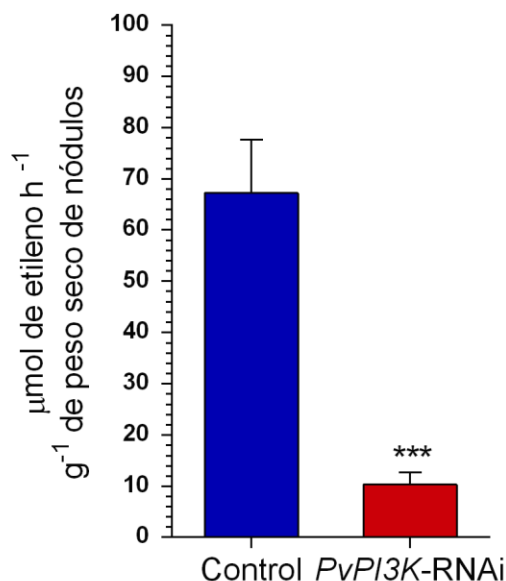


Figura 34. Actividad de la nitrogenasa en nódulos transgénicos de *P. vulgaris*.

Para determinar el funcionamiento de los nódulos transgénicos de poroto, se llevó a cabo un ensayo de reducción de acetileno en las raíces control (*Sac*-RNAi) y en las *PvPI3K*-RNAi como se indica en II.16. Los resultados de la actividad específica se muestran en μmoles de etileno $\cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco de nódulos colectados de plantas de dos experimentos ($n=6$).

En resumen, en las plantas compuestas con una reducción de 60% en los niveles de transcripción de *PvPI3K*, se incrementó la cantidad de hilos de infección abortados alcanzando un aumento de hasta 51 veces, la formación de primordios de nódulos y del número de nódulos disminuyó casi cinco y siete veces, respectivamente y en consecuencia, resultaron ineficientes en fijación de nitrógeno en comparación con las raíces de las plantas control.

V.4 La expresión del dominio FYVE imita el daño producido en la nodulación en raíces con pérdida de la función de PI3K

En las plantas compuestas de poroto con pérdida de la función de PI3K, el número total de nódulos se redujo drásticamente debido a múltiples factores, tales como la disminución del crecimiento apical y el enrulado de los pelos radicales y la alteración en el avance y ramificación de los hilos de infección detenidos en los pelos radicales en las primeras capas de células corticales. Para investigar si la proteína cinasa PI3K o el producto de su actividad, el PI3P, es requerido para la organogénesis de los nódulos, se usó un biosensor fluorescente para detectar PI3P. El biosensor utilizado, referido como dominio FYVE (*2x35S:YFP-2XFYVE*) (debido a que se encontró primero en cuatro proteínas ricas en cisteínas (Fab, YOTB, Vac1 y EEA1), se une específicamente con alta afinidad a PI3P (Stenmark *et al.*, 1996; Gaullier *et al.*, 1998; Patki *et al.*, 1998). Este biosensor se ha utilizado en diferentes tipos de plantas para ver la dinámica PI3P, p. ej. en protoplastos de caupí (*Vigna unguiculata*), en vesículas de diferentes tamaños en células BY-2 de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y en células epidermales de la raíz y estomas de *Arabidopsis* (Vermeer *et al.*, 2006).

Para estudiar la localización y función de PI3P durante la simbiosis, se obtuvieron raíces transgénicas de *P. vulgaris* que expresan el dominio FYVE (II.9), por medio de la transformación con *A. rhizogenes* K599 con la construcción *2X35S:YFP-2x FYVE* del vector amablemente donado por el Dr. Teun Munnick de la Universidad de Amsterdam, Holanda. El dominio FYVE está fusionado a una proteína amarillo fluorescente dirigido por un promotor fuerte (*2X35S:YFP*), lo cual permitió monitorear las raíces transgénicas por medio de microscopía confocal (LSCM). Para evaluar los eventos tempranos de la simbiosis nodular y analizar la infección de los pelos radicales, las raíces fluorescentes fueron inoculadas con *R. tropici-DsRed* (*Rt-DsRed*, rojo fluorescente). En las raíces transformadas con el dominio FYVE (o *YFP-2x FYVE*) la señal de fluorescencia se localizó en las células de la epidermis (PI3P unidos al dominio FYVE; **Figura 35 A**) y la progresión de los hilos de infección fue detenida en los pelos radicales sin afectar el ciclo celular de las células adyacentes al sitio de infección. Se observaron múltiples hilos de infección (cuatro o más) dentro del mismo pelo radical (**Figura 5 A**) que no avanzaron a las células corticales en división. En las raíces control transformadas con el vector vacío (*pEarley_104* que

expresa 35S-YFP o YFP) se observó señal de fluorescencia inespecífica con los hilos de infección avanzando hacia las células corticales en división (**Figura 35 B**). En las etapas tardías de la nodulación se estimó una reducción de cinco veces el número de nódulos en raíces que expresaron el biosensor, el dominio FYVE, comparadas con el control (**Figura 35 C**). El fenotipo de las raíces inoculadas que expresan YFP-2xFYVE, mostró hilos abortados (**Figura 35 A y Figura 36**) de forma similar al encontrado en las raíces con pérdida de la función de *PvPI3K*. Este resultado sugiere que el producto de la actividad catalítica de *PvPI3K* es parte del mecanismo de la función de esta cinasa durante la infección. Además, la participación de ambos PI3K y PI3P se correlacionó con la disminución de la autofagia durante la pérdida de la función de *PvPI3K* con la nodulación, ya que en las raíces que expresan *PvPI3K*-RNAi y la construcción del dominio FYVE, el número de nódulos de la raíz se redujo aproximadamente siete y cinco veces, respectivamente, con relación a las plantas control.

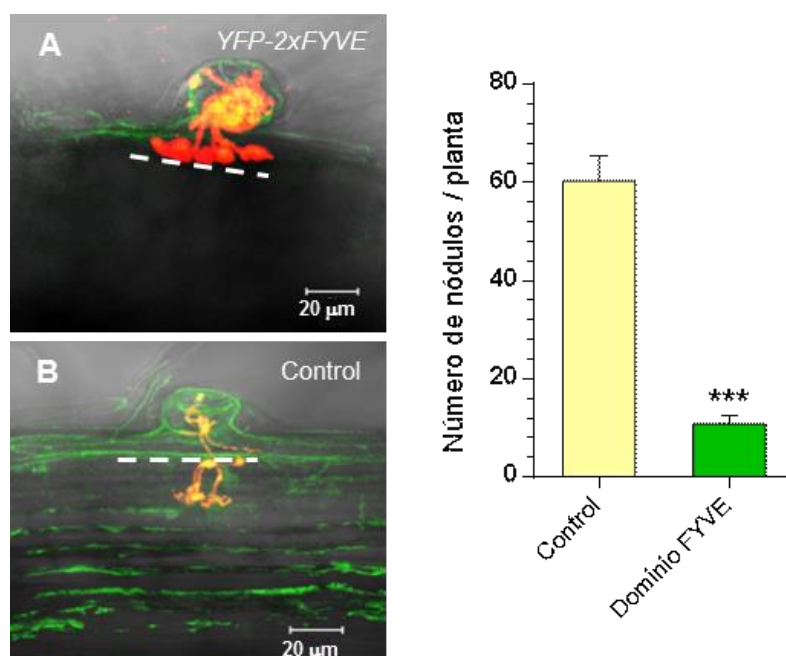


Figura 35. La expresión del dominio FYVE imita el daño en la nodulación producido en raíces con pérdida de la función de PI3K.

Las raíces transgénicas que expresan *YFP-2xFYVE* o el control (*YFP*) fueron inoculadas con *R. tropici*-DsRed y observadas en tejido fresco a 15 dpi en el microscopio confocal Zeiss LSM 510.

(A) Imagen representativa de un sitio de la infección en raíces que expresan *YFP-2xFYVE* revela el progreso del hilo de infección detenido que no avanza de la primera capa de células de la corteza exterior. Esta imagen fue adquirida utilizando 23 secciones ópticas de 0,89 μm . Imagen cortesía del [M.B. Neftaly Cruz \(2011\)](#). **(B)** Imagen representativa del progreso típico de los hilos de infección en las raíces transgénicas control. Se utilizaron 25 secciones ópticas de 1,0 μm . Barra= 20 μm . **(C)** Número de nódulos transgénicos producidos por las raíces control (*YFP*) y las que expresan

YFP-2xFYVE. Las barras representan la media \pm DS (n = 10 plantas compuestas a 21 dpi). Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron usando la prueba *t*-Student (***) $P < 0,006$).

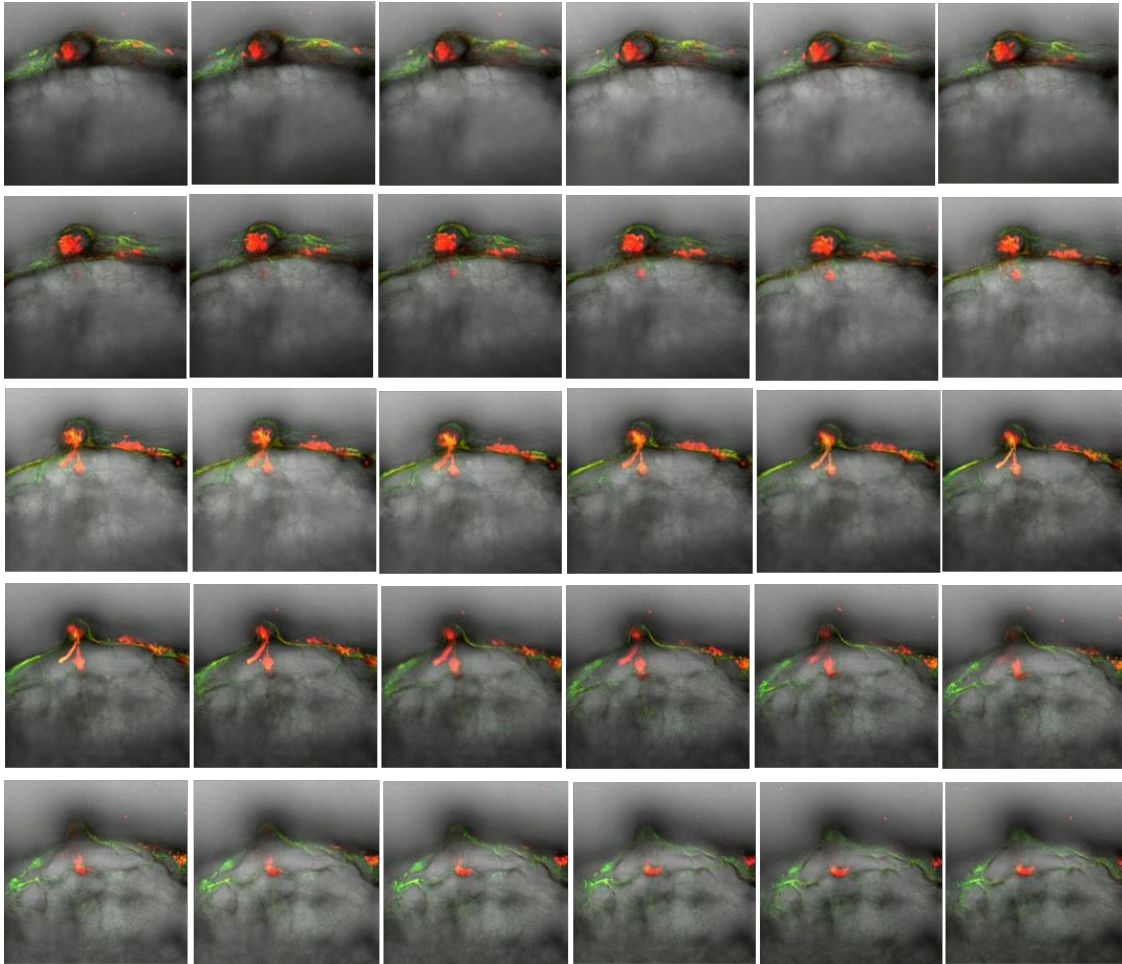


Figura 36. Fenotipo del hilo de infección del pelo radical de *P. vulgaris* expresando el dominio FYVE.

Imágenes sucesivas de una animación en un intervalo de tiempo (27 s) (de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) tomada de un pelo radical expresando *YFP-2xFYVE* de raíces *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici-DsRed*. Sobreposición de *YFP-2xFYVE* en verde, contraste de fase en gris y *R. tropici-DsRed* en rojo.

CAPÍTULO VI
EFFECTOS DE PI3K SOBRE LAS MICORRIZAS DE
P. VULGARIS

VI.1 La simbiosis de Hongos Arbusculares (HA) en plantas

Los resultados de la filogenia de la PvPI3K de poroto demostraron que pertenece a la subfamilia de las cinasas clase III presentes en organismos eucariontes cuya estructura genómica se encontró conservada en 15 de las 17 plantas analizadas, excepto para las algas unicelulares del phylum de las *Chlorophytas*, (las *Micomonas sp* y *Chlamidomonas reinhardtii*). Este resultado se correlacionó con la ausencia de los genes ortólogos de la ruta *Sym* en estas plantas y con la ocurrencia de los mismos en plantas del hábitat terrestre (Delaux *et al.*, 2013). Estos hallazgos se correlacionan con la estimación de que la simbiosis de la micorriza (“raíz fungosa”) arbuscular emergió hace alrededor de 450 millones de años entre las raíces de las plantas y los hongos que pertenecen al phylum *Glomeromycota*, del cual se calcula existen alrededor de 200 especies (Rausch *et al.*, 2001; Redecker *et al.*, 2000). Debido a que la simbiosis de hongos arbusculares (HA) emergió mucho tiempo antes que la simbiosis nodular, surgió el interés por investigar si PvPI3K, que pertenece a la clase III (el grupo más antiguo y conservado) de la familia PI3K, está involucrada en la respuesta simbiótica de *P. vulgaris* con este tipo de hongos.

En ambas interacciones simbióticas sus respectivos microsimbiontes se hospedan intracelularmente y comparten características evolutivas que son clave en el desarrollo del proceso. Como ya se mencionó, comparten un conjunto de genes de la Ruta *Sym*, que en la simbiosis nodular derivó a partir del sistema de la simbiosis de hongos arbusculares en plantas (Sprent, 2007). De forma similar a la simbiosis nodular se ha generado el modelo de la simbiosis de las micorrizas arbusculares, donde se muestran los componentes para el establecimiento de los simbiosiontes que funciona con el intercambio de moléculas señalizadoras (Figura 37). Las raíces de la planta secretan exudados de moléculas activas que incluyen las estrigolactonas (derivadas de metabolismo de los carotenoides), a su vez el hongo secreta LCOs micorrízicos (FMyc, Factores Myc), que se sabe estimulan la formación de micorrizas en especies de diversas familias de plantas, entre ellas las *Fabaceae* promoviendo el crecimiento y ramificación de la raíz (Maillet *et al.*, 2011). El primer contacto del hongo arbuscular con la raíz se hace a través del hipopodio (célula especializada del hongo que se ancla en la célula epidermal de la planta hospedera), el cual media el crecimiento de las hifas. En respuesta a este estímulo químico y mecánico, la planta responde formando un aparato de pre-penetración (PPA) el cual anticipa la dirección de la penetración de la hifa en la célula de la planta por remodelación del citoesqueleto. El hongo arbuscular crece inter e intracelularmente hasta alcanzar las células corticales donde desarrolla estructuras intracelulares especializadas *de novo*, conocidos como arbuscúlos (ramificación intracelular de las hifas) (Genre *et al.*, 2008).

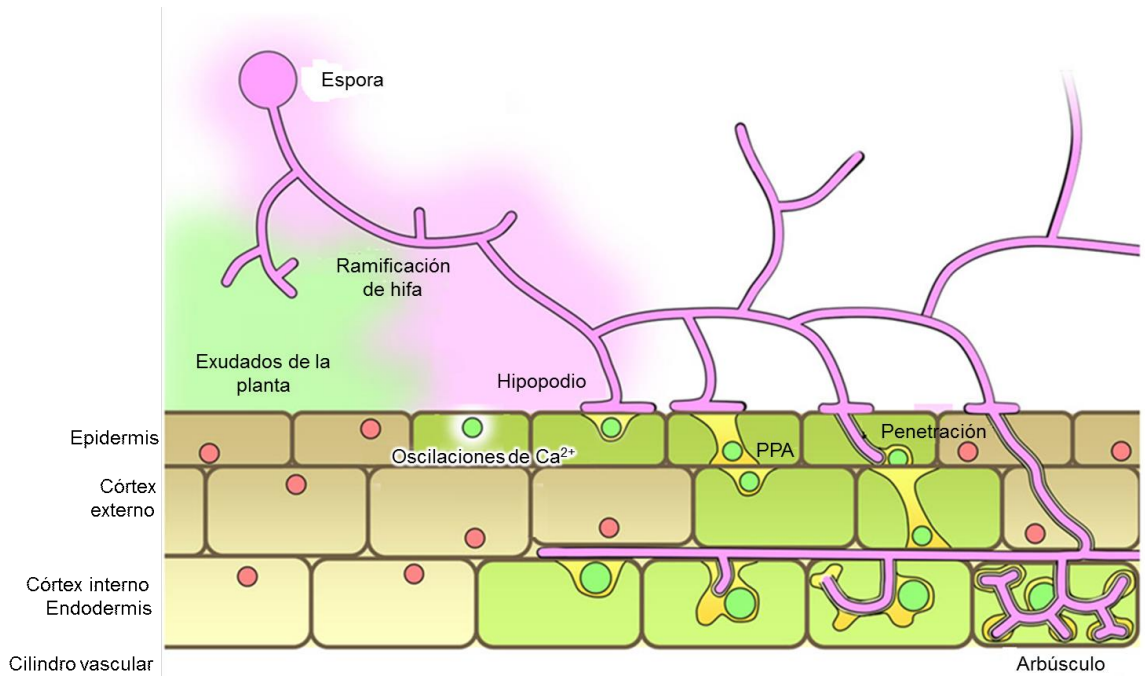


Figura 37. Esquema de la simbiosis de hongos arbusculares en plantas con flores.

La planta exuda compuestos que promueven la germinación de las esporas y la ramificación de las hifas aumentando su actividad. Estos hongos producen factores de micorrización (FMyc) que inducen la respuesta simbiótica, produciendo oscilaciones de calcio, activando genes relacionados con la simbiosis y formando los hipopodios que se desarrollan de las hifas maduras. Al contacto del hongo (HA) con la planta, se forma el aparato de pre-penetración (PPA, *pre-penetration apparatus*), el cual guía al hongo a las células del córtex. El hongo entra a las células de la planta por el apoplasto, crece lateralmente al eje de la raíz e induce estructuras de tipo PPA en el córtex. Las hifas entran a las células y se ramifican para formar los arbusculos. Fuera de la planta se forman nuevas esporas en la punta de las hifas y permiten la propagación de los hongos (Figura adaptada de [Bonfante y Genre, 2010](#)).

Esta interacción se considera una simbiosis de tipo mutualista donde ambos organismos se benefician. Los hongos arbusculares, entre otras funciones, tienen un papel muy importante en el ciclo de nutrientes, en la salud de las plantas y actúan como una extensión del sistema radical de las plantas que les permiten captar agua y nutrientes escasos o poco disponibles en el suelo. Son biótrofos obligados multinucleados y aparentemente asexuales. El intercambio de nutrientes es una característica central de la simbiosis de los hongos arbusculares ([Bonfante y Genre, 2015](#)). Los hongos obtienen de la planta glucosa y otros carbohidratos tipo hexosa como fuentes de carbono y energía. Los hongos arbusculares captan el fósforo del suelo y lo transfieren en forma de fosfato. El hongo transfiere el fósforo a las raíces a través de los arbusculos (hifas especializadas), pero el mecanismo molecular de este intercambio no se conoce, ni tampoco cómo la

planta regula la simbiosis en respuesta al *status* de nutrientes. Las plantas tienen muchos tipos de proteínas transportadoras de fosfato que incluyen la clada Pht1 y los miembros de esta subfamilia I solo se expresan en la simbiosis de los hongos arbusculares. En *Medicago truncatula* se ha demostrado que el transportador MtPT4, miembro de la subfamilia I se requiere para la adquisición de fosfato transferido por el hongo arbuscular y que la pérdida de su función produce la muerte prematura de los arbusculos (Javot *et al.*, 2007). Los ortólogos del transportador MtPT4 de *M. truncatula* están presentes en los genomas de todas las Angiospermas hospedadoras de los hongos arbusculares que se han secuenciado hasta la fecha. En arroz (*Oryza sativa*), álamo (*Populus spp*), papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*S. lycopersicum*), entre otras, se expresa específicamente en las raíces colonizadas por hongos micorrícicos (Delaux *et al.*, 2013).

VI.2 Los niveles de transcrito y la actividad del promotor de PvPI3K en las raíces de *P. vulgaris* después de la inoculación con el hongo *Rhizophagus irregularis*

Para ampliar nuestro estudio sobre la participación de PI3K en las interacciones mutualistas, se usó *Rhizophagus irregularis* (antes, *Glomus intraradices*), uno de los hongos arbusculares más estudiados y que establece asociaciones simbióticas obligadas con el sistema radical de la mayoría de las plantas vasculares (Read, 1999). Un análisis previo del genoma de *Rhizophagus irregularis* reveló que tiene características únicas adicionales, algunas son que las enzimas que degradan la pared celular están pobremente representadas. También tiene proteínas pequeñas secretadas que son abundantes y son expresadas principalmente durante la fase simbiótica (Bonfante y Genre, 2015). Se usó particularmente porque se reportó que *R. irregularis* coloniza raíces de *P. vulgaris* donde se observó la formación de estructuras arbusculares (Arthikala *et al.*, 2013).

Las raíces de poroto inoculadas con *R. irregularis* son fácilmente colonizadas a tres semanas post inoculación (spi) ($47,3 \pm 4,8\%$ RLC) y la expresión relativa del transportador PvPT-4 se induce a diferencia de las raíces no inoculadas (Arthikala *et al.*, 2013). Para determinar los niveles de transcrito de PI3K durante la micorrización, se utilizaron plántulas de *P. vulgaris* de tipo silvestre de cinco días de edad con raíces inoculadas con esporas de *R. irregularis*. Después de ser cultivadas como se describe en II.13, las raíces de las plantas se examinaron a las tres y seis semanas post inoculación (spi). Se utilizaron como controles plántulas no-inoculadas cultivadas bajo condiciones idénticas. La colonización fúngica se confirmó por tinción con azul de tripano (McGonigle *et al.*, 1990) y la cuantificación de los niveles de transcritos del transportador de fosfato T4 de *P. vulgaris* (PvPT-4) se hizo por RT-qPCR. Este transportador se ha utilizado en *P. vulgaris* como un indicador de la colonización progresiva (Arthikala *et al.*, 2013).

Como era de esperar, los niveles de transcrito del *PvPT-4* aumentaron en respuesta a la inoculación con *R. irregularis*, mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles de transcripción de *PvPI3K* entre las raíces colonizadas por hongos arbusculares y las no-inoculadas (**Figura 38 A**).

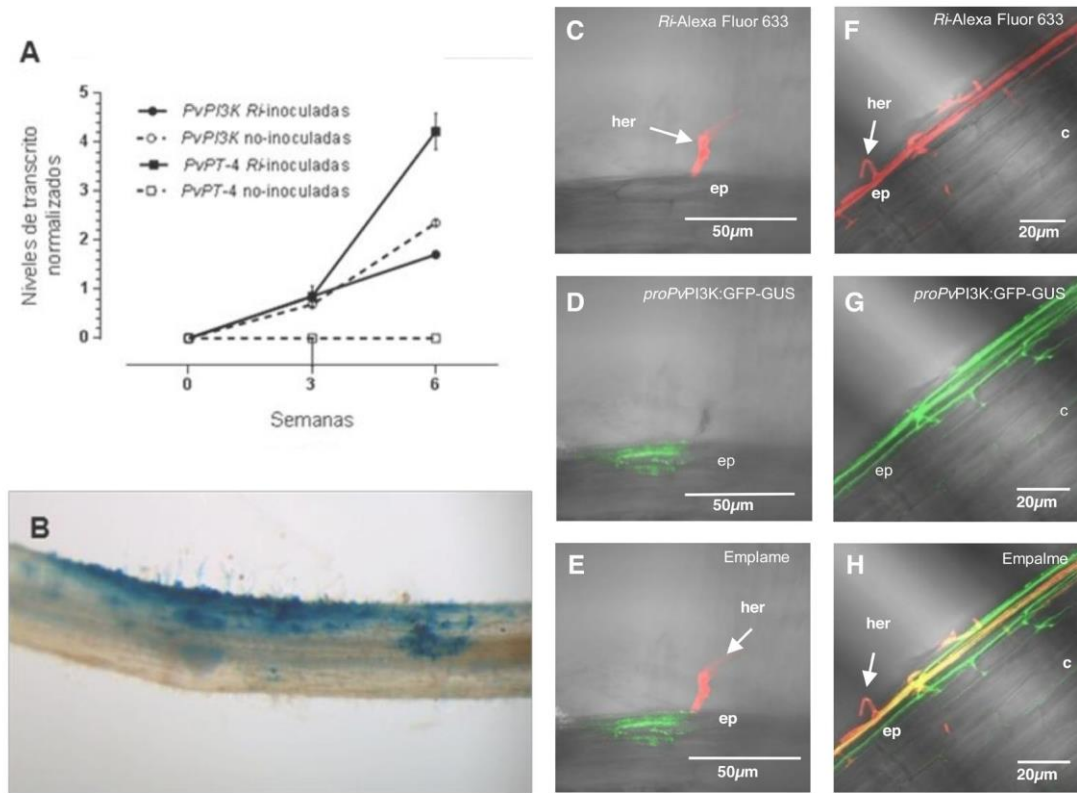


Figura 38. Niveles de transcrito y actividad del promotor de *PvPI3K* en raíces de *P. vulgaris* después de la inoculación con *Rhizophagus irregularis*.

(A) Los niveles de transcrito de *PvPI3K* y del transportador *PvPT-4* de proto se determinaron por RT-qPCR en raíces tipo silvestre inoculadas o no con *R. irregularis* colectadas a las tres y seis semanas. Los niveles de transcrito se normalizaron respecto al gen de referencia *EF1α* y los valores se cuantificaron como se describe en II.6.7. Las barras indican la media \pm DS de dos réplicas biológicas independientes (n= 2 de un grupo de 10 raíces). La diferencia significativa se determinó estadísticamente con la prueba t-Student (***) $P < 0,001$ (B) a (H) La actividad del promotor pro*PvPI3K*:GFP-GUS fue evaluada con GUS y con la proteína verde fluorescente (GFP) en raíces transgénicas de *P. vulgaris* inoculadas con el hongo arbuscular. (B) Actividad del promotor en una raíz transgénica inoculada con *R. irregularis*. (C) a (H) Imágenes de luz transmitida y confocal de raíces transgénicas inoculadas con *R. irregularis* muestran las hifas extrarradicales en la epidermis de la raíz y la expresión del promotor de *PvPI3K* en el sitio de entrada de hifas. (C) El hongo arbuscular se tiñó con el conjugado AGT-Alexa Fluor 633 (Ri-AGT-Alexa Fluor 633, fluorescencia roja). (D) y (E) La inducción de pro*PvPI3K*:GFP-GUS se detectó en las células epidérmicas y vecinas al punto de contacto de las hifas fúngicas. (F) (G) y (H, empalme) Fuerte expresión de

Figura 38. Continuación. proPvPI3K:GFP-GUS en las células que están debajo de las hifas extrarradicales extendiéndose. Imágenes representativas de las raíces transgénicas inoculadas a 3 spi con *R. irregularis*. Las imágenes fueron adquiridas *in vivo* utilizando un Microscopio Confocal LSM 510 Meta. **ep**, epidermis; **her**, hifas extrarradicales; **c**, corteza. Barras= 50 μm (**C**) a (**E**); Barras=20 μm (**F**) a (**H**).

Aunque la simbiosis de hongos arbusculares en *P. vulgaris* no se ha caracterizado al mismo nivel de detalle que en *M. truncatula* (Genre *et al.*, 2008), un reporte anterior describe algunas etapas de la infección en raíces de *P. vulgaris* (Arthikala *et al.*, 2013). Para estudiar la actividad espacio-temporal del promotor PvPI3K en raíces transgénicas inoculadas con *R. irregularis* que albergan la construcción proPvPI3K:GFP-GUS, se colectaron las raíces para analizarlas por microscopía óptica y confocal. Después de tres semanas de la inoculación con el hongo arbuscular y de cultivar las plantas como se describe en II.13, la actividad del gen reportero de *GUS* se observó en las células del cortex y en la epidermis de la raíz (Figura 38 B). El hongo *R. irregularis* se tiñó con un conjugado fluorescente de aglutinina de germen de trigo con Alexa Fluor 633 (AGT- Alexa-Fluor 633) (Arthikala *et al.*, 2013). La actividad del promotor de PvPI3K, revelada como la fluorescencia de la GFP, se observó en las células epidérmicas (Figura 38 D), en las células cercanas al punto de contacto de las hifas fúngicas (Figura 38 C y D, empalme) y en las células que están debajo de donde se extienden las hifas extrarradicales (Figura 38 F, G y H, empalme). Sin embargo, no se detectaron estructuras tipo-PPA, (Aparato de Pre-Penetración) lo que sugiere que el promotor de PvPI3K se activa antes de la formación del PPA. En las etapas tardías de la infección con el hongo arbuscular (más de 3 spi), las capas de células corticales no se pudieron analizar debido al grosor de raíces transgénicas de *P. vulgaris*.

VI. 3 La pérdida de la función de PvPI3K daña la simbiosis de los hongos arbusculares

Para saber si la simbiosis de micorrizas arbusculares de poroto requiere de PvPI3K, se analizaron raíces transgénicas que contienen el vector control (*Sac*-RNAi) y raíces con PvPI3K-RNAi colectadas después de 3 spi y se tiñeron con azul de tripano (ver II.14). Como se observa en la Figura 39 A, las raíces transgénicas del control que expresan TdT-*Sac*-RNAi mostraron un patrón típico de la colonización de micorrizas arbusculares, que incluye la penetración epidérmica de los hongos, la formación en compartimentos apoplásticos intracelulares, ramificación y la colonización fúngica de la corteza exterior e interior con abundantes arbusculos. Todas las estructuras fúngicas fueron identificadas, la hifa extrarradical e intrarradical, el hipopodio y arbusculos con troncos y ramas (Figura 39

A). Por el contrario, la típica infección micorrizal se afectó drásticamente en raíces transgénicas *PvPI3K-RNAi* (Figura 39 B).

En las raíces transgénicas afectadas se observó un mayor número de hifas extrarradicales e hipopodios que parecen estar detenidas en el sitio de contacto del hongo, comparadas con las raíces control (Figura 39 B). Por otra parte, a menudo se observaron en las hifas extracelulares estructuras con un tipo de crecimiento en forma de “dedo hinchado” (10,90 ± 1,13 / raíz) en las raíces transgénicas con pérdida de la función de *PvPI3K* (Figura 39 C, D y E), mientras que estas estructuras eran apenas detectables en las raíces transgénicas control (menos de 1/raíz) (Figura 39 E). Ocasionalmente, se encontraron hifas intrarradicales penetrando en la corteza exterior (Figura 39 B), pero la infección intracelular, en la epidermis, la corteza externa y la formación de arbusculos casi nunca se observó.

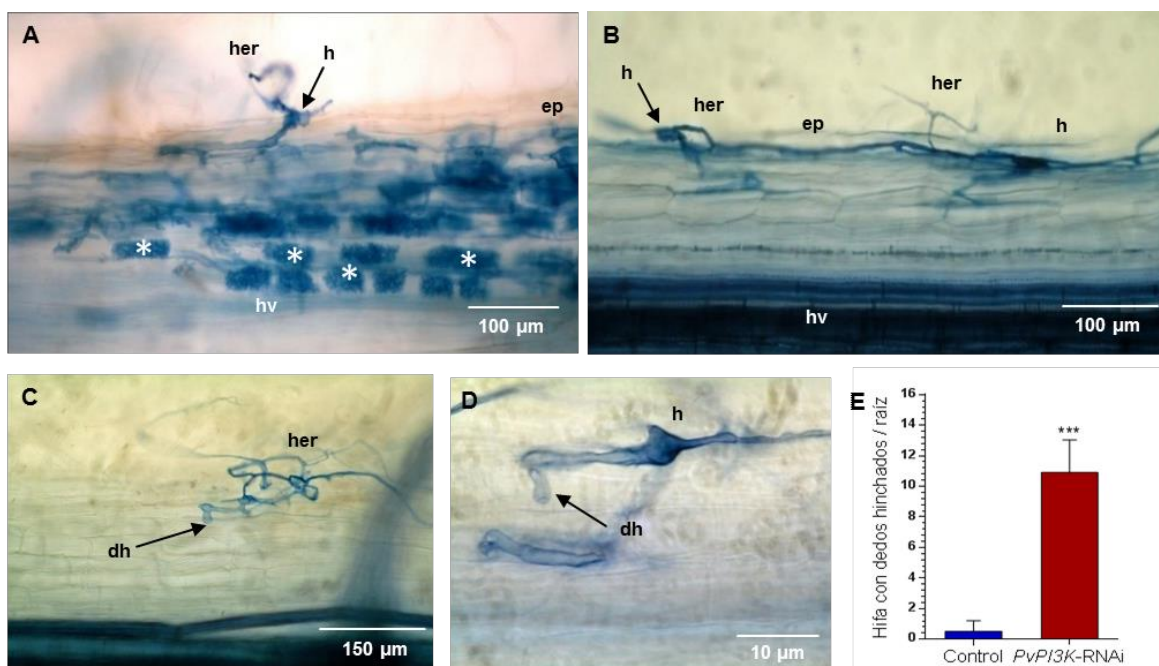


Figura 39. La pérdida de la función de *PvPI3K* perjudica la simbiosis de los hongos arbusculares de *P. vulgaris*.

(A) a (D) Colonización de los hongos arbusculares de las raíces transgénicas (3 spi) teñidas con azul de tripano. (A) Las raíces transgénicas control (*Sac-RNAi*) muestran la típica colonización de hongos arbusculares con abundantes arbusculos. (B) Las raíces transgénicas *PvPI3K-RNAi* exhiben escasas hifas que entran y se ramifican dentro de las células epidérmicas. (C) y (D) En las hifas extrarradicales ramificadas se encontró la formación de estructuras conocidas como dedos hinchados. **her**, hifa extrarradical; **ep**, epidermis; **dh**, en forma de “dedo hinchado”; **h**, hipopodio; **hv**, haz vascular; *, arbusculos. Barras (A) y (B) 100 μm, (C) 150 μm y en (D) 10 μm. (E) El número

Figura 39. Continuación. de hifas en forma de “dedos hinchados” en raíces transgénicas *PvPI3K*-RNAi y control. Los datos son la media \pm DS de tres experimentos independientes (n=33). La significancia estadística se determinó utilizando la prueba *t*- Student (***) $P < 0,001$.

VI.4 La pérdida de la función de *PvPI3K* impide la colonización de hongos arbusculares y la expresión del transportador de fosfato *PvPT-4*

Para estimar la propagación fúngica en las raíces de *P. vulgaris* con pérdida de la función de *PvPI3K* se cuantificó el porcentaje total de colonización por longitud de la raíz (%RLC) de acuerdo al método de McGonigle *et al.* (1990), en raíces transgénicas *PvPI3K*-RNAi y en las raíces control (*Sac*-RNAi) a las tres y seis semanas pos inoculación con *R. irregularis*. En raíces transgénicas *PvPI3K*-RNAi, se encontraron porcentajes de colonización (%RLC) con el hongo de $7 \pm 1,2$ y $11,16 \pm 3,5$ a las 3 y 6 spi, respectivamente. Estos valores representan una reducción de 5,25 veces con respecto a las raíces transgénicas control (*Sac*-RNAi) donde se encontró un porcentaje de $41,50 \pm 2,0$ y $65,0 \pm 5,0$ a las 3 y 6 spi, respectivamente (**Figura 40 A**).

La activación transcripcional del transportador *PvPT-4* durante la colonización del hongo arbuscular, también se vio afectada en raíces transgénicas *PvPI3K*-RNAi inoculadas con *R. irregularis*.

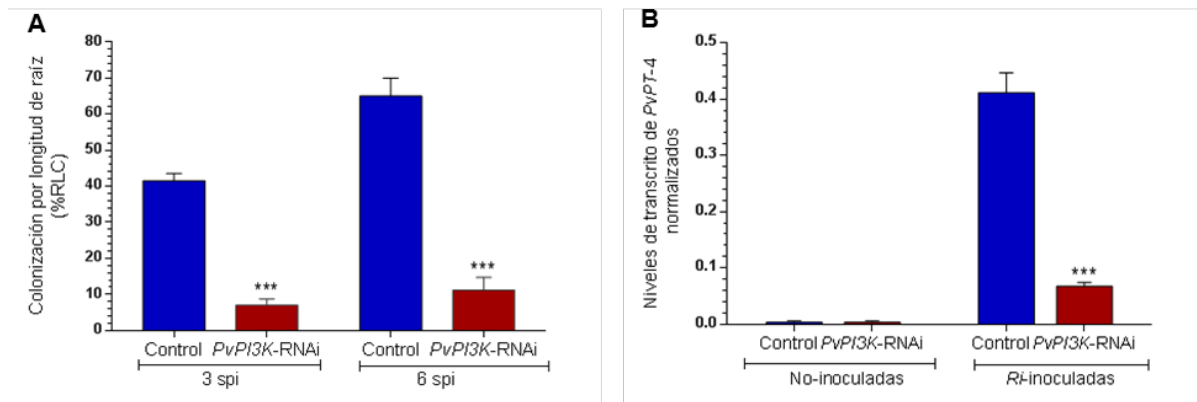


Figura 40. Continuación. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas con la prueba *t*-Student (**P <0,004).

Como se muestra en la **Figura 40 B**, los niveles de transcrito del transportador (*PvPT-4*) fueron muy bajos en raíces transgénicas *PvPI3K* ($0,081 \pm 0,009$) comparados con los de raíces control *Sac*-RNAi ($0,41 \pm 0,036$) después de 3 semanas post inoculación.

El monitoreo de la respuesta a la inoculación con *R. irregularis* de las raíces transgénicas con pérdida de la función de *PvPI3K*, mostró un fenotipo en la etapa temprana de la interacción, en la respuesta presimbiótica molecular durante la formación del hipopodio con estructuras de "dedos hinchados". Además correlacionó con la disminución significativa de los transcritos de *PvPT-4* en las raíces *PvPI3K*-RNAi micorrizadas en comparación con las raíces de control. Estos resultados sugieren una disfuncionalidad por ausencia de arbusculos en las raíces silenciadas. Dado que las mutantes en dos de los genes ortólogos de la ruta *Sym* (*CCamK*, *Calcium and calmodulin-dependent protein kinase* y *Cyclops*, *protein that features a nuclear localization signal*) muestran un fenotipo similar al mostrado en este trabajo, con varias hinchazones en la superficie rizodérmica de arroz ([Gutjahr et al., 2008](#)), se estimó la acumulación de transcritos de estos genes en raíces con pérdida de la función *PvPI3K* y raíces del control micorrizadas. No hubo diferencias significativas en los niveles de la proteína cinasa *PvCaCamK* y su interactor *PvCyclops* en raíces *PvPI3K*-RNAi en relación con sus respectivos controles (datos no mostrados). Por lo tanto, estos resultados también sugieren que el fenotipo tipo "dedo hinchado" observado en las raíces con pérdida de la función de *PvPI3K*, podría ser debido a una ruta independiente de la ruta *Sym* (de la transcripción de *PvCCamK* y *PvCyclops*) en poroto.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES, AVANCES Y PERSPECTIVAS

VII.1 PI3K participa en dos procesos importantes de *P. vulgaris*, la simbiosis y el desarrollo celular

Como se mostró en el análisis filogenético PI3K clase III está muy conservada entre los organismos eucariontes. *A. thaliana*, que pertenece a la familia de las *Brassicaceae* del grupo de plantas que no son capaces de interactuar con simbiontes como los hongos arbusculares, carece de varios genes involucrados en la ruta *Sym* o genes que son requeridos para el establecimiento de estas relaciones (Zhu *et al.*, 2006; Delaux *et al.*, 2013). Por otra parte, los defectos observados en plantas heterocigotas de *Arabidopsis* en PI3K (*VPS34/vps34*) se observaron en múltiples estadios durante el proceso reproductivo, incluyendo el desarrollo del polen, así como también su germinación, elongación y la fertilización (Lee *et al.*, 2008b). Las mutantes de *Arabidopsis* no sobreviven a la pérdida de *AtVps34* indicando que PI3K es un gen conservado que está comprometido para funciones del desarrollo. En este caso, en las raíces de *P. vulgaris* encontramos que PI3K de *P. vulgaris* es esencial para el crecimiento de los pelos radicales. Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo sugieren que en plantas leguminosas, PI3K evolucionó para tomar parte en funciones especializadas como la simbiosis.

En este estudio se encontró que la expresión de PI3K se incrementó días después de la inoculación de raíces de poroto con *R. tropici* y en nódulos maduros (Figura 23 B y 23 D, respectivamente). Sin embargo, estudios recientes de expresión sugieren que PI3K no se induce durante la infección con rizobio (Breakspear *et al.*, 2014). En el infectoma del pelo radical de *Medicago truncatula* se obtuvo el seguimiento de la expresión génica durante la infección con rizobio bajo determinadas condiciones de crecimiento. Si no se encontraron transcritos relacionados con autofagia en el infectoma del pelo radical, probablemente se debió a que la vida media de estos transcritos y de las proteínas es corta. Roux y colaboradores (2014) reportaron que en el nódulo indeterminado *MtPI3K* es altamente expresada en la zona de fijación de nitrógeno, lo cual concuerda con nuestros datos, donde los transcritos fueron localizados *in situ* en las células infectadas del nódulo. Además, hemos observado que los niveles de transcrito de *PvPI3K* y la actividad de nódulos de poroto (Figura 24 B3 y C3) también aumentaron, correlacionando con los niveles máximos de fijación de nitrógeno en los nódulos maduros (Figura 23 D y Figura 26 D).

La actividad del promotor de *PvPI3K* se encontró durante el proceso de infección con *Rhizobium* en los pelos radicales de raíces inoculadas, durante la formación del hilo de infección, en las células corticales en división del primordio de nódulo y en la zona de infección del nódulo maduro (Figura 26 A-D). Lo cual señala que se requiere de la expresión de PI3K para el proceso de infección en las etapas tempranas de la nodulación,

para el desarrollo normal del primordio de nódulo, así como para tener un nódulo funcional en etapas tardías de la simbiosis.

En la senescencia del nódulo, el promotor de *PvPI3K* sólo está activo en los haces vasculares del nódulo, lo que sugiere que *PvPI3K* también puede funcionar en la movilización de nutrientes procedentes del viejo órgano a través del haz vascular.

VII.2 La pérdida de la función de PI3K inhibe la infección de *P. vulgaris* con *R. tropici* y con *R. irregularis* durante los eventos tempranos de la simbiosis

Los resultados de este trabajo demuestran que PI3K tiene un papel previamente desconocido en las interacciones mutualistas. Durante de la simbiosis de *P. vulgaris*-*Rhizobium spp.*, en las raíces transgénicas que perdieron la función de *PvPI3K* mediante su silenciamiento con RNAi, se deterioraron dramáticamente las respuestas tempranas como el enrollado del pelo radical en presencia del rizobio y el avance del hilo de infección de estas células epidérmicas. Se afectó el crecimiento del hilo de infección de una célula a otra, ya que el hilo de infección quedó detenido en los pelos radicales, sin avanzar a las células corticales. Estos resultados sugieren fuertemente que PI3K también es esencial para el crecimiento normal del hilo de infección. La regulación a la baja de esta cinasa perjudicó la formación de la estructura tubular del hilo de infección impidiendo la penetración de los rizobios.

Sorpresivamente no se inhibió la división de las células corticales, los nódulos desarrollados de las raíces pilosas *PvPI3K*-RNAi fueron pocos y más pequeños, se observó que carecían de rizobios, en algunos casos las bacterias permanecieron en la superficie, en el pelo radical formando el hilo de infección y en otros casos los nódulos estaban pobremente infectados (**Figura 33 B-C y Figura 33 D-F**). Esto debido a que la formación de los hilos de infección y de los nódulos son eventos independientes, a diferencia del hilo de infección que se forma en los pelos radicales, la organogénesis de los nódulos se induce en las células corticales internas después de la percepción de los factores de nodulación por las células epidérmicas. Para su desarrollo, los nódulos requieren de una señalización de hormonas de la planta (citocininas) que está asociada con cambios en los niveles de auxinas. En el caso de simbiosis con hongos arbusculares, en raíces de poroto con pérdida de función de PI3K, las hifas de *Rhizophagus irregularis* no entraron en las células epidérmicas y corticales. En consecuencia, no se formaron los típicos arbusculos y sólo se observaron estructuras parecidas a “dedos hinchados” (parecidos a hipopodios) (**Figura 39 B-E**). Estas estructuras no pudieron entrar en las células epidérmicas. Se desconoce la señal que dispara la formación de hipopodios, pero sí que es específica de pared celular epidermal. Por lo tanto, hemos presentado datos convincentes de que PI3K juega un papel

clave en las etapas tempranas de ambas interacciones simbióticas en las raíces de *P. vulgaris*.

VII.3 PI3K es esencial para el crecimiento apical de los pelos radicales y del hilo de infección de *R. tropici*

Los pelos radicales son células vegetales altamente especializadas, que al igual que los tubos de polen, presentan un crecimiento altamente polarizado, es decir, una expansión localizada en la punta. Las complejas redes de señalización, que incluyen el influjo de iones y los gradientes localizados de especies reactivas de oxígeno, convergen en las puntas de los pelos radicales, junto con la reorganización del filamento de la actina y el tráfico incrementado de la membrana (Fu *et al.*, 2001; Hepler *et al.*, 2001; Sieberer *et al.*, 2005; Cardenas *et al.*, 2008; Oldroyd, 2013). Los fármacos que inhiben la actividad PI3K en los tubos de polen y en los pelos radicales, perjudican el crecimiento y desarrollo adecuados (Helling *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2008b). El pretratamiento con inhibidores de PI3K, tales como LY294002 (LY) y Wortmanina (WM), también inhiben la reorganización de filamentos de actina inducidos por ácido abscísico en estomas de *Arabidopsis* (Choi *et al.*, 2008). Además se ha demostrado en la fracción asociada con el citoesqueleto la actividad de PI3K en células de zanahoria en cultivo (Dove *et al.*, 1994).

Nuestros resultados muestran que PvPI3K desempeña un papel clave en el crecimiento polar de los pelos radicales (**Figura 28 D**) como previamente se ha demostrado con el inhibidor LY en *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2008a), aunado a los reportes con el inhibidor específico que también afecta el citoesqueleto, es posible que tanto los filamentos de actina y PI3K, a través de PI3P, están asociados en el mantenimiento del crecimiento apical. Actualmente se sabe muy poco acerca de los procesos que regulan el paso del hilo de infección de una célula a la siguiente y se desconoce el mecanismo por el cual el crecimiento del hilo de infección se detiene dentro de los pelos radicales. En este caso, encontramos que el proceso que permite la migración del hilo de infección de una célula a otra parece estar alterado con la disminución de PI3K. En muchas leguminosas el movimiento del núcleo del pelo radical parece guiar el crecimiento y la dirección de los hilos de la infección, donde los filamentos de actina y los microtúbulos tienen un papel prominente. El núcleo migra a la base de la raíz para guiar la formación del hilo de infección de una manera dependiente del citoesqueleto (Lloyd *et al.*, 1987), pero se desconoce cómo se regula esta guía. Nuestros resultados sugieren que PI3K es un regulador clave del crecimiento polar del hilo de infección. Los niveles de PI3P en plantas son relativamente bajos, típicamente comprendiendo aproximadamente 2-15% de fosfoinosítidos (PIP) y tienen una velocidad de recambio rápida (Meijer *et al.*, 2001). En

Arabidopsis, las plantas heterocigotas VPS34/Vps34 no muestran fenotipo aparente de longitud de pelo radical en comparación con plantas de tipo salvaje. Por el contrario, las plantas homocigotas Vps34/Vps34 no son viables. Cuando las plantas de *Arabidopsis* se tratan con LY, el inhibidor específico de PI3K, el crecimiento de la punta de los pelos radicales se inhibe rápidamente de una manera dependiente de la dosis (Lee *et al.*, 2008a). Además la expresión de la construcción 2xFYVE bajo un promotor fuerte también tiene un efecto directo en la longitud del pelo radical de *Arabidopsis*, debido a su reducida tasa de crecimiento. La reducción de los niveles de PI3P mediante la expresión de la fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), o el tratamiento con el inhibidor de PI3K Wortmanina en tubos de polen de tabaco conduce a la acumulación de ATG8 en los cuerpos autofágicos vacuolares (Zhang *et al.*, 2011). Estos hallazgos sugieren que los niveles de PI3P regulan los genes de autofagia durante el crecimiento apical de los pelos radicales y los tubos de polen y sostienen una tasa de crecimiento rápida de estas células.

VII.4 La sobreexpresión del dominio FYVE fenocopia la pérdida de la función de PvPI3K durante la nodulación de poroto

PI3P se une a las proteínas a través de sus dominios FYVE, que están muy conservados evolutivamente. Estos dominios han sido ampliamente utilizados como sondas para monitorizar la localización subcelular de PI3P (Gilloly, 2000; Vermeer *et al.*, 2006). En particular el dominio FYVE es el más utilizado como biosensor de PI3P porque se ha demostrado su localización en endosomas, vacuolas y autofagosomas, así como el enriquecimiento en las membranas internas. El hecho es que la expresión de YFP-2xFYVE en las raíces peludas de poroto imita (fenocopia) el efecto de la pérdida de función de PvPI3K durante la simbiosis, lo que sugiere que PI3P, el producto catalítico de PI3K, es esencial para las interacciones mutualistas de *P. vulgaris* con microorganismos benéficos. En los organismos en general son pocas las proteínas para las que se ha predicho contienen el dominio FYVE. Hasta el año 2005, se predijeron quince proteínas con dominio FYVE en el genoma de *Arabidopsis*. El análisis de secuencia y la caracterización biofísica de modelos estructurales de estos dominios, muestra que tienen características estructurales diferentes a las de otros organismos, implicando que pueden jugar un papel único específico en plantas.

VII.5 El complejo PI3K que inicia el proceso de autofagia es esencial para la relación simbiótica de *P. vulgaris* con *Rhizobium* y con el hongo de arbuscular

En levadura PI3K forma parte de dos complejos multiproteicos referidos como PI3K o VPS34 I y II que están evolutivamente muy conservados. El complejo I participa en la autofagia y el complejo II participa en la clasificación endocítica. Ambos complejos

contienen un núcleo formado por las proteínas de clasificación vacuolar, VPS34, VPS15 y VPS30/BECLINA1; la proteína VPS15, recluta PI3K hacia la membrana y la activa, mientras que BECLINA1 se requiere para la formación de autofagosomas. Estos complejos son funcionalmente distintos, cuando el núcleo del complejo se une a la proteína relacionada con autofagia 14 (*Autophagy related protein 14*), regula la autofagia mediante la unión específica del complejo al sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS, así llamado en levadura). Cuando se une a la proteína VPS38, media la interacción entre los componentes del núcleo para regular la clasificación endocítica (Kametaka *et al.*, 1998; Kihara *et al.*, 2001b; Kim *et al.*, 2013; Rostislavleva *et al.*, 2015). La principal función del complejo I es generar PI3P en el sitio de nucleación del autofagosoma, (PAS) y reclutar proteínas de unión a PI3P. Aunque no se ha encontrado ATG14 en las plantas, en *Arabidopsis*, el núcleo del complejo PI3K se asocia de forma indirecta a la proteína P2 con dominio SH3, el cual también se une a PI3P e interactúa con la proteína relacionada con autofagia 8 (ATG8), participando en la formación del autofagosoma (Zhuang *et al.*, 2013). ATG8 es una proteína requerida para la formación de membranas autofagosomales y es crucial para la maduración de autofagosomas.

En relación a los integrantes del núcleo, se ha reportado que la delección de *Beclina1* bloquea el reclutamiento de las ATGs requeridas para el ensamblaje de la estructura preautofagosomal (PAS) y se inhibe la autofagia (Suzuki *et al.*, 2001). En el caso de la delección de *Vps34* o *Vps15* da como resultado la completa pérdida de actividad autofágica, como se describe en otros mutantes defectuosos en la autofagia (mutantes *aug*), lo mismo sucede con la supresión de *Atg14* (Tsukada y Ohsumi, 1993; Thumm *et al.*, 1994; Kihara *et al.*, 2001b). El hecho de que la regulación a la baja de los niveles de transcripción de *PvPI3K* con el RNAi también afectó negativamente a la acumulación de transcritos que codifican para las proteínas que participan en la formación del autofagosoma (*Beclina1*, *Vps15* y *Atg8*), indica que están implicadas en el proceso de autofagia (Figura 41).

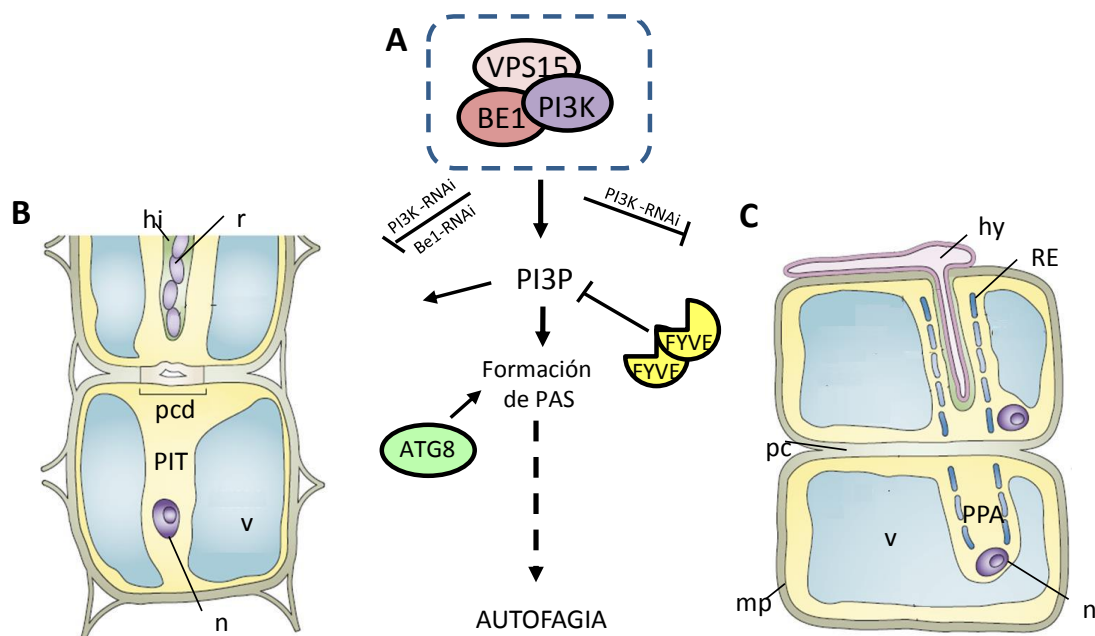


Figura 41. Modelo propuesto de la participación de PI3K en las células epidérmicas de la raíz durante la formación de estructuras endosimbióticas.

(A) PI3K forma parte del núcleo del complejo (VPS15-BE1-PI3K) y contribuye a la producción de PI3P junto con ATG8 para iniciar la formación de estructuras pre-autofágicas (PAS), donde el citoesqueleto es el soporte de crecimiento y maduración. Cuando los niveles de transcrito de PI3K disminuyen (por PI3K-RNAi), también disminuyen los transcritos de los componentes del núcleo (*Vps15* y *Be1*), así como los del gen relacionado con autofagia *Atg8*. **(B)** En consecuencia en la simbiosis nodular, los hilos de infección con rizobio se abortan quedando detenidos en la célula epidermal dañando la nodulación. Con *Be1*-RNAi o cuando se sobre expresa el dominio FYVE que se une específicamente a PI3P, también encontramos un fenotipo de nodulación inhibida. **(C)** Por otra parte la disminución de los niveles de transcrito de PI3K afecta el establecimiento del hongo arbuscular, incrementando las hifas de los hipopodios que muestran aborcciones (dedos hinchados). Esto impide el avance de las hifas hacia las células del cortex que deberían ser guiadas por el aparato de pre penetración (PPA) para la colonización. **BE1**, BECLINA1; **PAS**, estructura pre-autofagosomal; dominio **FYVE** con dedos de zinc, encontrado en las proteínas Fab 1, YOTB, VAC 1 y EEA1; **hi**, hilo de infección; **r**, rizobio; **pcd**, pared celular debilitada; **PIT**, pre-hilo de infección; **n**, núcleo; **v**, vacuola; **hy**, hipopodio; **RE**, retículo endoplásmico; **PPA**, aparato de pre-penetración; **pc**, pared celular; **mp**, membrana plasmática (Modificada de Parniske, 2008).

Entre los transcritos del núcleo del complejo PI3K, *PvBeclina1* fue uno de los que mostraron una acumulación reducida. Para confirmar si este gen que participa en autofagia también correlacionaba con la simbiosis, se utilizó *Beclina1*-RNAi para ver su efecto en la nodulación de las raíces de *P. vulgaris*. El número de nódulos formados en las raíces de poroto con pérdida de función de *PvBeclina1* también se redujo en comparación

con las plantas control. Este resultado indica que la pérdida de función de *PvBeclina1* conduce a un fenotipo muy similar al observado en las raíces pilosas de *PvPI3K-RNAi* y al encontrado con la sobreexpresión del dominio FYVE en plantas de poroto, el cual recapituló el mismo fenotipo. Este resultado confirma que la autofagia es esencial para las interacciones mutualistas de *P. vulgaris* con microorganismos simbióticos.

VII.6 Avances y perspectivas

Los miembros de la familia PI3K se regulan de forma diferente, participan en diversos procesos incluyendo autofagia y su función parece depender del tipo de célula. En células animales el PI3P, el producto catalítico de PI3K clase II y clase III, media el reclutamiento de proteínas que originan membranas autofágicas y de aquí que juegan un papel esencial en la ruta de autofagia canónica (macroautofagia). A diferencia del PI3P (producto de la PI3K clase I), el [PI(3,4,5)P₃] dispara una señalización que inhibe autofagia. Dos de sus cuatro isoformas se expresan solamente en leucocitos, mientras que se expresa poco en otros tejidos. La actividad de las PI3K clase I está estrictamente controlada por la activación de cinasas de tirosina tipo receptor y a receptores acoplados a proteínas G. La regulación de la clase I está incrementada en enfermedades inflamatorias y de cáncer lo que ha llevado al estudio de los inhibidores farmacológicos específicos de PI3K para aplicación clínica.

De forma similar las isoformas de PI3K clase II están regulada por receptores acoplados a proteínas G. Una de las tres isoformas se restringe al hígado, otra isoforma se ha encontrado que controla el transporte de glucosa, secreción de insulina y endocitosis; otra de las isoformas está implicada en la regulación de la progresión del ciclo celular, supervivencia del crecimiento y migración celular. Se ha propuesto que PI3K clase II es una fuente alternativa de PI3P en membranas pre-autofágicas para sostener autofagia en ausencia de PI3K clase III. Debido a que en ratones con la pérdida de una de las isoformas clase II mueren en el desarrollo embrionario, otros ratones con mutaciones en otra isoforma clase II sobreviven con una esperanza de vida corta.

Para las PI3K clase III o Vps34 no está clara la forma de regulación por estímulos extracelulares. Se conoce que está afectada moderadamente por varios tipos de agonistas y no se excluye la posibilidad de fluctuaciones locales de su actividad durante la fagocitosis en neutrófilos. En células animales determinar la función de PI3K clase III es más complicada porque PI3K clase II también puede producir PI3P *in vivo*. Además como forma parte del núcleo del complejo PI3K, interacciona con varias proteínas accesorias (ej. ATG14) de las cuáles su función en autofagia y tráfico endocítico es controversial. Resulta interesante que de las proteínas interactoras con los componentes del complejo, algunas tienen dominios que censan la curvatura de membrana, otras interactúan con el

citoesqueleto. En ratones se han identificado como supresoras de tumor y su disfunción está asociada con cáncer en humanos. En *Drosophila melanogaster* la deficiencia en alguno de los componentes del núcleo (PI3K, Vps15 y Beclina1) o en PI3K inactiva, se han observado defectos en autofagia en el epitelio del disco imaginal del ojo, cuerpo gordo y tejido intestinal.

A diferencia de las células animales, en levaduras y en plantas solamente se encuentra presente PI3K clase III que sintetiza PI3P. Por otra parte las plantas poseen pocos receptores putativos de proteínas G y a la fecha no se ha descrito receptores de cinasas de tirosinas. Los estudios de PI3K en *Arabidopsis* muestran que es importante para el desarrollo de la planta, tanto en los órganos vegetativos como reproductivos. El uso de los inhibidores farmacológicos LY y WM se ha relacionado con diversos eventos fisiológicos celulares como, el movimiento de las estomas, reorganización de actina, crecimiento apical y en la respuesta a infección por rizobio en los pelos radicales en *M. truncatula*. La PI3K clase III también parece tener un papel importante en endocitosis. Utilizando como biosensor el dominio FYVE fluorescente, se ha localizado PI3P *in vivo* en compartimentos endosomales tardíos prevacuolares de células de tabaco, en endosomas de *Arabidopsis* y en el tráfico de proteínas de la vacuola. La principal contribución de este trabajo fue demostrar la participación de PI3K clase III en un proceso que involucra la formación de estructuras de doble membrana en *P. vulgaris*, planta leguminosa de gran importancia nutricional y económica.

Los estudios aquí presentados con la pérdida de la función de PI3K clase III de *P. vulgaris*, nos permitió tener avances importantes sobre su papel a nivel subcelular durante la interacción de esta planta con microorganismos benéficos. Con el uso de imágenes, se encontró la afectación de la infección del rizobio en los pelos radicales, así como la penetración en las células del cortex y el desarrollo de hifas de hongos arbusculares en el cortex interno de la raíz, concurrente con la disminución de la expresión de Atg8 y de los componentes del núcleo de autofagia.

Entre las relaciones mutualistas, los modelos de la interacción leguminosa-rizobio y planta-hongos arbusculares, son los ejemplos mejor estudiados de las interacciones planta-microorganismo. Se conocen 25 genes conservados de lo que se denomina el “*tool kit* simbiótico” en las plantas hospederas de hongos arbusculares, que incluye los genes de la ruta *Sym*. Este trabajo allana el camino para el estudio de una nueva ruta de señalización de la simbiosis que involucra PI3K clase III en autofagia en plantas.

Nuestros resultados sugieren que la autofagia provee de precursores para el crecimiento del pelo radical y el hilo de infección, pero aparentemente no para las divisiones celulares corticales durante la organogénesis del nódulo de poroto. Los sitios de penetración de las células de la epidermis de la raíz por las hifas (hipopodios) y la formación de arbusculos

del hongo también parecen requerir precursores derivados del proceso autofágico. Recientemente, Mi y colaboradores reportaron que en células animales la polimerización de actina en filamentos cortos y los niveles de PI3P procedente del complejo PI3K son cruciales para la forma y expansión del fagóforo (precursores de los autofagosomas) e iniciar la autofagia (Mi *et al.*, 2015). En conjunto, estos datos indican que la autofagia tiene una función clave en las interacciones mutualistas entre la planta y los microorganismos simbióticos.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la participación de PI3K en autofagia durante la simbiosis de *P. vulgaris*, podríamos acercarnos para conocer el mecanismo molecular de su participación en este proceso. Puede ser a través del estudio de los integrantes del núcleo del complejo PI3K, donde Beclina1 es un candidato ideal ya que constituye la plataforma de proteínas que interactúan con otros ligandos del complejo que determinan su función.

Otra proteína de especial interés es la proteína relacionada con autofagia 8 (ATG8), la cual es el marcador de autofagia por excelencia. En plantas ATG8 se diversificó desde un gen en algas, hasta múltiples genes en plantas superiores, se pensaba que podrían tener funciones redundantes y al parecer participan en funciones especializadas. En *Arabidopsis* hay 9 genes que muestran expresión específica de tejido. En *Glycine max*, de 12 genes encontrados, uno de ellos se induce en déficit de nitrógeno, mientras que en *M. truncatula* hay 4 genes por analizar. Se ha propuesto que la expansión de la familia ATG8 en plantas se debe a la autofagia selectiva y que está mediada por receptores que interactúan con ATG8. Los receptores reclutan cargas específicas en los autofagosomas los cuáles funcionan como organelos de la autofagia. Los cargos son acarreados a los compartimentos líticos de la célula o para su reciclamiento a la membrana plasmática para secreción. Los cargos incluyen una variedad de componentes, tales como organelos dañados, proteínas agregadas y microorganismos invasores.

En este trabajo analizamos dos ATG8s de *P. vulgaris*, los cuáles disminuyeron con la pérdida de la función de PI3K. Se podrían analizar los promotores de estos genes para probar si la inducción de su expresión es específica de la simbiosis. También se podría fusionar a proteínas fluorescentes (GFP- ATG8 o DsRed-ATG8) para demostrar la presencia de cuerpos autofágicos en condiciones simbióticas. Dado que hay seis isoformas de ATG8 en *P. vulgaris*, se puede hacer un análisis comparativo con las ATG8 de plantas para explorar su evolución y la autofagia selectiva. Esto facilitaría el estudio de la relación entre éstas con rutas de autofagia en funciones especializadas como la simbiosis, que determinen ventajas selectivas de las plantas como organismos sésiles.

CAPITULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson y Gustafson** (1989) Hypocholesterolemic effects of oat and bean products, Michigan Dry Bean Digest, **13**, 2–5
- Antonsson B.** (1997) Phosphatidylinositol synthase from mammalian tissues. Biochim Biophys Acta **1348** (1-2), 179-86
- Arthikala M.K., Montiel J., Nava N., Santana O., Sánchez-López R., Cárdenas L., Quinto C.** (2013) PvRbohB negatively regulates *Rhizophagus irregularis* colonization in *Phaseolus vulgaris*. Plant Cell Physiol **54**, 1391-1402
- Akkerman A.D.L., Abdulkadir S., Trinick M.J.** (1978) Nitrogen-fixing root nodules in *Ulmaceae*. Nature **274**, 190–190
- Backer J.M.** (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. Biochem J **410**, 1-17
- Baulcombe D.** (2004) RNA silencing in plants. Nature **431**, 356–363. doi: 10.1038/nature02874
- Bapaume L. y Reinhardt, D.** (2012) How membranes shape plant symbioses: signalling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. Frontiers in Plant Science **3**, 223: 1-17
- Bassham D.C., Laporte M., Marty F., Moriyasu Y., Ohsumi Y., Olsen L.J., Yoshimoto K.** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. Autophagy **2**(1), 2-11
- Beebe S., Gonzalez A.V., Rengifo J.** (2000) Research on trace minerals in the common bean. Food Nutr Bull **21**, 387–391. doi:10.1016/j.plantsci.2013.11.009
- Bernard P. y Couturier M.** (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II Complexes. J Mol Biol **226**, 735-745
- Bernard P., Kezdy K E., Melderer L V., Steyaert J., Wyns L., Pato M.L., Higgins P.N., Couturier M.** (1993) The F Plasmid CcdB Protein induces efficient ATP-dependent DNA Cleavage by Gyrase. J Mol Biol **234**, 534-541
- Bitocchi E. et al.** (2013) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. New Phytol **197**, 300–313
- Blanco F.A., Meschini E.P., Zanetti M.E., Aguilar O.M.** (2009) A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-*Rhizobium* symbiotic association. Plant Cell **21**, 2797-2810
- Bond J.E. y Gresshoff P.M.** (1993) Soybean transformation to study molecular physiology. In Plant Responses to the Environment, 25-44
- Bonfante P., y Genre A.** (2010) Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nat Commun **27**, 1-48
- Bonfante P., y Genre A** (2015) Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak ‘plantish’ or ‘fungish’? Trends in Plant Science **20**, 3

- Breakspear A., Chengwu L., Roy S., Stacey N., Rogers Ch., Trick M., Morieri, G., Kirankumar S. Mysore, K., Wen, J., Giles E.D. Oldroyd G., Downie, J.A., Jeremy D., Murray J.D.** (2014). The root hair "Infectome" of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell* **25**, 4680-4701
- Brewin N.J.** (2004) Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit Rev Plant Sci* **23**, 293–316
- Broghammer A., Krusell L., Blaise M., Sauer J., Sullivan J.T., Maolanon N., Vinther M., Lorentzen A., Madsen E.B., Jensen K.J., Roepstorff P., Thirup S., Ronson C.W., Thygesen M.B., Stougaard J.** (2012) Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 13859–64
- Broughton W. J., y Dilworth M.** (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J* **125**, 1075-1080
- Byfield MP, Murray JT, Backer J.M** (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem* **280** (38), 33076-82
- Campos F., Solórzano R.M., Garcíarrubio A., José M. Colmenero-Flores J.M., Covarrubias A.** (1997) A *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding a putative aquaporin (Accession No. U97023). *Plant Physiol* **115**, 313
- Cárdenas L., Holdaway-Clarke T.L., Sánchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G., Hepler P.K.** (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiol* **123**, 443-452
- Cárdenas L., Lovy-Wheeler A., Kunkel J.G, Hepler P.K.** (2008) Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. *Plant Physiol* **146**, 1611-21
- Carlson R.W., Forsberg L.S., Kannenberg E.L.** (2010) Lipopolysaccharides in *Rhizobium*-legume symbioses. *Subcell Biochem* **53**, 339-386
- Castro-Guerrero N.A., Isidra-Arellano M., Mendoza-Cozatl D.G., Valdés-López O.** (2016) Common Bean: A legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1-7
- Catoira R., Galera C., DeBilly F., Penmetsa R.V., Journet E. P., Maillet F., Rosenberg C H., Cook D., Gough C., Dénarié J.** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**, 1647–1665
- 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**, 3582–3593
- Choi Y., Lee Y., Jeon B. W., Staiger C., Lee Y.** (2008) Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate modulates actin filament reorganization in guard cells of day flower. *Plant, Cell and Environment* **31**, 366-377

Chomczynski P., y Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9

Christoforidis S., McBride H.M., Robert D. Burgoyne R.D., Marino Zerial M. (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625

Compaan B., Yang W.C., Bisseling T., Franssen H. (2001) ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*-legume interaction and the highly conserved internal region of the gene does not encode a peptide. *Plant Soil* **230**, 1–8

Corvera S., D'Arrigot A., Stenmark H. (1999) Phosphoinositides in membrane traffic. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 460-465

Crespi M., Jurkevitch E., Poiret M., d'Aubenton-Carafa Y., Petrovics G., Kondorosi E., Kondorosi A. (1994) Enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a nontranslatable RNA involved in plant growth. *EMBO J* **13**, 5099–5112

Cruz N. (2011) Patrones de expresión y localización de la fosfatidilinositol 3-cinasa durante a simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*. Licenciatura en Biología. Universidad Veracruzana. México

Cruz N. (2014) La participación Beclina 1 (BECN1) durante la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*. Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos, México

de Bary H.A. (1879) Die Erscheinung der Symbiose (Karl J. Trubner, Strasburg, citado en inglés en **Relman D.A.** "Till death do us part": coming to terms with symbiotic relationships (2008) *Nature Reviews Microbiology* **6**, 721-724

Dbouk H.A., Vadas O., Shymanets A., Burke J.E., Salamon R.S., Khalil B.D., Barrett M.O., Waldo G.L., Surve C., Hsueh C., Perisic O., Harteneck C., Shepherd .PR., Harden T.K., Smrcka A.V., Taussig R., Bresnick A.R., Nürnberg B., Williams R.L., Backer J.M. (2012) G protein-coupled receptor-mediated activation of p110 β by G $\beta\gamma$ is required for cellular transformation and invasiveness. *Sci Signal* **5** (253), ra89.

Delaux P.M., Sejalon-Delmas N., Becard G., Ane J.M. (2013) Evolution of the plant–microbe symbiotic 'toolkit'. *Trends in Plant Science* **18**, 298–304

Delaux P.M., Varala K., Edger P.P., Coruzzi GM., Pires J.C., Ané J.M. (2014) Comparative phylogenomics uncovers the impact of symbiotic associations on host genome evolution. *PLoS Genetics* **10**, e1004487

Delgado-Salinas A., Bibler R., Lavin M. (2006) Phylogeny of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae*): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* **31**, 779-791

Denancé N., Szurek B., Noël L.D. (2014) Emerging functions of nodulin-like proteins in non-nodulating plant species. *Plant Cell Physiol* **55**, 469-74

Dénarié J., y Cullimore J. (1993) Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74**, 951–54

- Diebold R. y Noel D.** (1989) *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: Biochemical and genetic analyses and symbiotic behavior on three hosts. *J of Bacteriology* **171**, 4821-4830
- Dolan, L., Duckett, C.M., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C., Roberts, K.** (1994) Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**, 2465–2474
- Domin J., y Waterfield M.D.** (1997) Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Letters* **410**, 91-95
- Dove S.K., Lloyd C.W., Drobak B.** (1994) Identification of phosphatidylinositol-3oh kinase in plant cells. *Biochem. J.* **303**, 347-350
- Downie J.A.** (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 150-170.
- Dubrovsky J.G., Soukup A., Napsucialy-Mendivil S., Jeknic Z., Ivanchenko M.G.** (2009) The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany* **103**, 807–817
- Ehrhardt D.W., Wais R., Long S.R.** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681
- El Yahyaoui F., Küster H., Ben Amor B., Hohnjec N., Pühler A., Becker A., Gouzy J., Vernié T., Gough C., Niebel A., Godiard L., Gamas P.** (2004) Expression Profiling in *Medicago truncatula* Identifies More Than 750 Genes Differentially Expressed during Nodulation, Including Many Potential Regulators of the Symbiotic Program. *Plant Physiology* **136**, 3159-3176
- Ellson C.D., Anderson K.E., Morgan G., Chilvers E.R., Lipp P., Stephens L.R., Hawkins P.T.** (2001) Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. *Curr Biol* **11**, 1631-1635
- Emerich D.W. y Krishnan H.B.** (2014) Symbiosomes: temporary moonlighting organelles. *Biochem J.*, **460** (1), 1-11
- Engstrom E.M., Ehrhardt D.W., Mitra R.M. Long S.R.** (2002) Pharmacological analysis of nod factor-induced calcium spiking in *Medicago truncatula*. Evidence for the requirement of type IIA calcium pumps and phosphoinositide signaling. *Plant physiology* **128**, 1390-1401
- Esseling J.J., Lhuissier F.G., Emons A.M.** (2003) Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol* **132**, 1982-8
- Estrada-Navarrete G., Alvarado-Affantranger X., Olivares J.E., Díaz-Camino C., Santana O., Murillo E., Guillén G., Sánchez N., Acosta J., Quinto C., Li D., Gresshoff P.M., Sánchez F.** (2006) *Agrobacterium rhizogenes*-transformation of the *Phaseolus spp.*; A tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1385-1393
- Estrada-Navarrete G., Alvarado-Affantranger X., Olivares J.E., Guillén G., Díaz-Camino C., Campos F., Quinto C., Gresshoff P. M., Sánchez F.** (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus spp.* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* **2**, 1819-1824

- Estrada-Navarrete G., Cruz-Mireles N., Lascano R., Alvarado-Affantranger X., Hernandez-Barrera A., Barraza A., Olivares J.E., Arthikala M.K., Cardenas L., Quinto C., Sanchez, F.** (2016) An autophagy-related kinase is essential for the symbiotic relationship between *Phaseolus vulgaris* and both rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **28**, 2326-2341
- Falasca M., y Maffucci T.** (2012) Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem J* **443** (3), 587-601
- 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**, 61-76
- Frayse N., Couderc F., Poinot V.** (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**, 1365-1380
- Fritsch R., de Krijger I., Fritsch K., George R., Reason B., Kumar M.S., Diefenbacher M., Stamp G., Downward J.** (2013) RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Cell* **153** (5), 1050-63
- Fry M.J.** (1994) Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochem Biophys Acta* **1226**, 237-268
- Fry M.J.** (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res* **3**, 304–312
- Fu Y., Wu G., Yang Z.** (2001) Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tube. *Journal of Cell Biology* **152**, 1019-1032
- Funakoshi, T., Matsuura, A., Noda, T., Ohsumi Y.** (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **192**, 207-213
- Gage D.J.** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 280–300.
- Galvez y Salinas** (2015) El papel del frijol en la salud nutrimental de la población mexicana. *Revista digital universitaria* **16**, No. 2. <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art12>
- Gaullier J.M., Simonsen A., D'Arrigo A., Bremnes B., Stenmark H., Aasland R. et al.,** (1998) FYVE fingers bind PtdIns (3)P. *Nature* **394**, 432-3
- Genre A., Chabaud M., Faccio A., Barker D.G., Bonfante P.** (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* **20**, 1407-142
- Gepts P. et al.** (2008) Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the Tropics, En: P.H. Moore y R. Ming (Eds.), *Genomics of Tropical Crop Plants*, Berlin: Springer, 113-143
- Geurts R., Fedorova E., Bisseling T.** (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 346–52

- Geurts T., y Bisseling T.** (2002) *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *The Plant Cell*, **14**, S239-S249
- Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C.** (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic Infection. *Annual Review of Genetics* **42**, 413-441
- Gillooly D. J., Morrow I.C., Lindsay M., Gould R., Bryant N.J., Gaullier J.M, Parton R.G., Stenmark H.** (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* **19**, 4577-4588
- Gillooly D.J., Simonsen A., Stenmark H.** (2001) Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem J* **355**, 249–258
- Giovanetti M., y B. Mosse** (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* **97**, 447-453
- Graham P.H., y Vance C.P.** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* **131**, 872–877
- Guillerment-Guibert Guibert J., Bjorklof K., Salpekar A., Gonella C., Ramadani F., Bilancio A., Meek S., Smith A.J., Okkenhaug K., Vanhaesebroeck B.** (2008) The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 8292-7
- Gutjahr C., Banba M., Croset V., An .K, Miyao A., An G., Hirochika H., Imaizumi-Anraku H., Paszkowski U.** (2008) Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* **20**, 2989-3005
- Gutjahr C. y Parniske M.** (2013) Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**, 593-617
- Hadri A.E., y Bisseling T.** (1998) Responses of the Plant to Nod Factors. In: Spaink H.P., Kondorosi A., Hooykaas J.J. (Eds.) *The Rhizobiaceae*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publisher, pp 403-416
- Hanaoka H., Noda T., Shirano Y., Kato T., Hayashi H., Shibata D., Tabata S., Ohsumi Y.** (2002). Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol* **129**, 1181-93.
- He J., Vora M., Haney R.M., Filonov G.S., Musselman C.A., Burd C.G., Kutateladze A.G., Verkhusha V.V., Stahelin R.V., Tatiana G., Kutateladze T.G.** (2009) Membrane insertion of the FYVE domain is modulated by pH. *Proteins* **76**, 852–860
- Helling D., Possart A., Cottier S., Klahre U., Kost B.** (2006) Pollen tube tip growth depends on plasma membrane polarization mediated by tobacco PLC3 activity and endocytic membrane recycling. *The Plant Cell* **18**, 3519–3534
- Hepler P.K., Vidali L., Cheung A.Y.** (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 159–187

- Herman P.K., y Emr S.D.** (1990) Characterization of *VPS34*, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 6742–6754
- Hernandez L.E., Escobar C., Dr̄bak B., Bisseling T., Brewin N.** (2004) Novel expression patterns of phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase in nodulated *Medicago* spp. *Plants. Journal of Experimental Botany* **55**, 957-959
- Hiles I.D., Otsu M., Volinia S., Fry M.J., Gout I., Dhand R., Panayotou G., Ruiz-Larrea F., Thompson A., Totty N.F., Hsuan J.J., Courtneidge S., Parker P.J., Waterfield M.** (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* **70**, 419-29
- Hong Z. y Verma D.P.** (1994) A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 9617-9621
- Howard J.B., y Rees D.C.** (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemical Reviews*, **96**, 2965-2982
- Islas-Flores T., Guillén G., Alvarado-Affantranger X., Lara-Flores M., Sánchez F., Villanueva M.A.** (2011) PvRACK1 loss-of-function impairs cell expansion and morphogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. root nodules. *Mol Plant Microbe Int* **24**, 819-26
- Ivanov S., Fedorova E.E., Limpens E., De Mita S., Genre A., Bonfante P. Bisseling T.** (2012) *Rhizobium*–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceed of the Natl Acad of Sci* **109**, 8316-8321
- Javot H., Penmetsa R.V., Terzaghi N., Cook D.R. Harrison M.J.** (2007) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1720-1725
- Jean S., y Kiger A.** (2014) Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *Journal of Cell Science* **127**, 923–928
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W.** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**, 3901 -3907
- Kamada Y., Funakoshi T., Shintani T., Nagano K., Ohsumi M., Ohsumi Y.** (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* **150**, 1507–1513
- Kametaka S., Okano T., Ohsumi M., Ohsumi Y.** (1998) Apg14p and Apg6/Vps30p forma protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 22284-22291
- Karimi M., Inze D. Depicker A.** (2002) Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193–195
- Katso R., Okkenhaug K., Ahmadi K., White S., Timms J., Waterfield M.D.** (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 615-75

- Kihara A., Noda T., Ishihara N., Ohsumi Y.** (2001a) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **15**, 519–530
- Kihara A., Kabeya Y., Ohsumi Y., Yoshimori T.** (2001b) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* **2**, 330-335
- Klionsky D.J. y Ohsumi Y.** (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 1-32
- Klionsky D.J., Cuervo A.M., Seglen P.O.** (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* **3**, 181-206
- Koske, R.E., y Gemma J.N.** (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* **92**, 486-505
- Kosuta S., Hazledine S., Sun J., Miwa H., Morris R.J., Downie J.A., Oldroyd G.E.D.** (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc of the Nat Acad of Sci USA*, **105**, 9823–9828
- Lagunas B., Schäfer P., Gifford M.L.** (2015) Housing helpful invaders: the evolutionary and molecular architecture underlying plant root-mutualist microbe interactions. *J Exp Bot* **66**, 2177-86.
- Landy A.** (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem* **58**, 913-949
- Le Bars R. Marion J., Le Borgne R., Satiat-Jeunemaitre B., Bianchi M.W.** (2014) ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. *Nat Commun* **5**, 4121
- Lee C.C., Ribbe M.W., Hu Y.** (2014) Chapter 7, Cleaving the N, N triplet bond: the transformation of dinitrogen to ammonia by nitrogenases. *Metal Ions in Life Sciences* **14**, 147-176
- Lee Y., Bak G., Choi Y., Chuang W.I., Cho H.T., Lee, Y.** (2008a) Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiol.* **147**, 624-635
- Lee Y., Kim E.S., Choi Y., Hwang I., Staiger C.J., Chung Y.Y., Lee Y.** (2008b) The Arabidopsis phosphatidylinositol 3-kinase is important for pollen development. *Plant physiology* **147**, 1886-1897
- Leshem Y., Seri L., Levine A.** (2007) Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J.* 2007 **51**, 185-97
- Levine B., y Klionsky D.J.** (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy *Dev Cell* **6**, 463-477
- Lewis G., Schrire B., MacKinder M. Lock** (eds) (2005) *Legumes of the world*. Royal Botanical Gardens, Kew, UK

- Limpens E., Mirabella R., Fedorova E., Franken C., Franssen H., Bisseling T., Geurts R.** (2005) Formation of organelle-like-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10375-80
- Lindmo K., y Stenmark H.** (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Cell Science* 605-514
- Liu Y., Schiff M., Czymmek K., Talloczy Z., Levine B., Dinesh-Kumar S.P.** (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**, 567-577
- Liu Y., y Bassham D.C.** (2012) Autophagy: pathways for self-eat-ing in plant cells. *Annu Rev Plant Biol*; **63**, 215- 37
- Livak K.J., y Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)). *Method Methods* **25**, 402-408
- Lloyd C.W., Pearce K.J., Rawlins D.J., Ridge R.W., Shaw P.J.** (1987) Endoplasmic microtubules connect the advancing nucleus to the tip of legume root hairs, but F-actin is involved in basipetal migration. *Cell Motil Cytoskel* **8**, 27-36
- Lohar D.P., Sharopova N., Endre G., Penuela S., Samac D., Town C., Silverstein K.A., VandenBosch K.A.** (2006) Transcript analysis of early nodulation events in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **140**, 221-234
- Maillet F., Poinot V., André O., Puech-Pagès V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martinez E.A., Driguez H., Bécard G., Dénarié J.** (2011) Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**, 58-63
- Marino D., Andrio E., Danchin E.G., Oger E., Gucciardo S., Lambert A., Puppo A., Pauly N.** (2011) A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol* **189**, 580-592
- Marty F.** (1999) Plant vacuoles, *Plant Cell* **11**, 587-600
- Matsuura A., Tsukada M., Wada Y., Ohsumi Y.** (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **192**, 245-250
- Mc Clean P.E., et al.** (2008) *Phaseolus vulgaris*: a diploid model for soybean. Stacey G. (Eds.) *Soybean Genomics*, Berlin Springer, 55-78.
- McGonigle T. P., Millers M.H., Evans D.G., Fairchild G.L. Swan J.A.** (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **115**, 495-501.
- Meijer H.J., Berrie C.P., Iurisci C., Divecha N., Musgrave A., Munnik T.** (2001) Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *The Biochemical journal* **360**, 491-498
- Mergaert P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., et al.** (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 5230-35

- Mi N., Chen Y., Wang S., Chen M., Zhao M., Yang G., Ma M., Su Q., Luo S., Shi J., Xu J., Guo Q., Gao N., Sun Y., Chen Z., Yu L.** (2015) CapZ regulates autophagosomal membrane shaping by promoting actin assembly inside the isolation membrane. *Nature Cell Biology* **17**, 1112-1122
- Michaeli S., Galili G., Genschik P., Fernie A.R., Avin-Wittenberg T.** (2016) Autophagy in Plants – What's New on the Menu? *Trends in Plant Science* **21**, 134-144
- Miki T., Park J.A., Nagao K., Murayama N., Horiuchi T.** (1992) Control of segregation of chromosomal DNA by sex Factor F in *Escherichia coli* mutants of DNA Gyrase Subunit A suppress *letD (ccdB)* product growth inhibition. *J Mol Biol* **225**, 39-52
- Miller J.H.** (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. CHS, New York.
- Miwa H., Sun J., Oldroyd G.E., Downie J.A.** (2006a) Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant Journal* **48**, 883-894
- Montiel J., Nava N., Cardenas L., Sanchez-Lopez R., Kumar Arthikala M., Santana O., Sanchez F., Quinto C.** (2012) A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by *Rhizobia*. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1751–1767
- Munnik T., Irvine R.F., Musgrave A.** (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1389**, 222–272
- Munnik T., y Veermer J.E.M.** (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* **33**, 655–669
- Muñoz J.A., Coronado C., Perez-Hormaeche J., Kondorosi A., Ratet P., Palomares A.J.** (1998) MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa *Rhizobium meliloti* interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9687–92
- Nakatogawa H., Ichimura Y., Yoshinori Ohsum Y.** (2007) Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell* **130**, 165–178
- Nezis I.P., Sagona A.P., Schink K.O. y Stenmark H.** (2010) Divide and ProsPer: the emerging role of PtdIns3P in cytokinesis. *Trends Cell Biol* **20**, 642-649
- Nikawa J y Yamashita S.** (1997) Phosphatidylinositol synthase from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1348**, 173-8
- Nobukuni T. Joaquin M., Roccio M., Dann D.G., Kim S.Y., Gulati P., Byfield M.P., Backer J.M., Francois Natt F., Bos J.L., Fried J. T. Zwartkruis F.J.T., Thomas G.** (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *PNAS* **102**, 14238-14243
- Nutman P.S.** (1959) Some observations on root-hair infection by nodule bacteria. *J Exp Bot* **10**, 250–263
- O´Farrel F., Rusten T.E., Stenmark H.** (2013) Phosphoinositide 3-kinases as accelerators and brakes of autophagy. *FEBS Journal* **280**, 6322–6337

- O'Rourke J.A., Iñiguez L.P., Fu F., Bucciarelli B., Miller S.S., Jackson S.A., McClean P.E., Li J., Dai X., Zhao P.X., Hernandez G., Vance C.P.** (2014) An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics* **15**, 866
- Obara K., Noda T., Niimi K., Oshumi Y.** (2008) Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* **13**, 537–547
- Oldroyd G.E.D., y Downie J.A.** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual review of plant biology* **59**, 519-546
- Oldroyd G.E.D., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A.** (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**, 119–44
- Oldroyd G.E.D.** (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**, 252-63
- Oohmah D., Corbé A., Balasubramanian P.** (2010) Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *J Agric Food Chem* **58**, 8225-8230
- Op den Camp R. Streng A., De Mita S., Cao Q., Polone E., Liu W., Ammiraju J.S.S., Kudrna D., Wing R., Untergasser A.** (2011) LysM-type mycorrhizal receptor recruited for *Rhizobium* symbiosis in the non-legume Parasponia. *Science* **331**, 909–912
- Parniske M.** (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol* **6**, 763–775
- Peleg-Grossman S, Volpin H, y Levine A.** (2007) Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *J. Exp. Bot.* **58**, 1637-1649
- Pieterneel V.R., y Vanderleyden J.** (1995) The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiological Reviews* **59**, 124-142
- Pingret J.L., Journet E.P., Barker D.** (1998) *Rhizobium* Nod Factor Signaling: Evidence for a G Protein–Mediated Transduction Mechanism. *The Plant Cell* **10**, 659–671
- Phillips D.A., y Kapulnik Y.** (1995) Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends Microbiol* **3**, 58-64.
- Posor Y., Eichhorn-Gruenig M., Puchkov D., Schöneberg J., Ullrich A., Lampe A., Müller R., Zarbakhsh S., Gulluni F., Hirsch E. et al.** (2013) Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature* **499**, 233–237
- Prell J., Bourdes A., Kumar S., Ludwig E., Hosie A., et al.** (2010) Role of symbiotic auxotrophy in the *Rhizobium*-legume symbioses. *PLoS ONE* **5**, e13933
- Proost S., Van Bel M., Sterck L., Billiau K., Van Parys T., Van de Peer Y., Vandepoele K.** (2009) PLAZA: a comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. *The Plant Cell* **21**, 3718-3731

Pueppke SG, y Broughton WJ. (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 293-318

Qin, G., Ma, Z., Zhang, L., Xing, S., Hou, X., Deng, J., Liu, J., Chen, Z., Qu, L.J., Gu, H. (2007). *Arabidopsis* AtBECLIN 1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Res* **17**, 249-263

Quelas J.I., Mongiardini E.J., Casabuono A., López-García S.L., Althabegoiti M.J., Covelli J.M., Pérez-Giménez J., Couto A., Lodeiro A.R. (2010) Lack of galactose or galacturonic acid in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 exopolysaccharide leads to different symbiotic responses in soybean. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1592-1604.

Raiborg C., Schink K.O., Stenmark H. (2013) Class III phosphatidylinositol 3-kinase and its catalytic product PtdIns3P in regulation of endocytic membrane traffic. *FEBS J* **280**, 2730-2742

Rameh L.E., Toliás K.F., Duckworth B.C., Cantley L.C. (1997) A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **390**, 192-6 **Rameh L.E. y Cantley L.C.** (1999) The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function. *The J of Biol Chemistry* **274**, 8347-8350

Rausch C., Daram P., Brunner S., Jansa J., Laloi M., Leggewie G., Amrhein N., Bucher M. (2011) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**, 462-70

Read D.J. (1999) The ecophysiology of mycorrhizal symbioses with special reference to impact upon plant fitness. En: M.C. Press J.D. Scholes y M.J. Barker (Eds) *Physiological plant ecology*. Blackwell Science, London, 133-152

Redecker D., Kodner R., Graham L. E. (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**, 1920-1921

Reggiori F., y Klionsky D.J. (2013) Autophagic processes in yeast: Mechanism, machinery and regulation. *Genetics* **194**, 341-361

Relman D.A. (2008) 'Til death do us part': coming to terms with symbiotic relationships. *Nat Rev Microbiol* **6**, 721-4

Ridge R.W., y Rolfe B.G. (1985). *Rhizobium* sp. degradation of legume root hair cell-wall at the site of infection thread origin. *Appl Environ Microbiol* **50**, 717-20

Rodriguez-Llorente I.D., Perez-Hormaeche J., El Mounadi K., Dary M., Caviedes M.A., et al. (2004) From pollen tubes to infection threads: recruitment of *Medicago* floral pectic genes for symbiosis. *Plant J* **39**, 587-98

Rosendahl L., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1991) Organic and inorganic inputs into legume root nodule nitrogen fixation. In *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*, Stud. Plant Sci. 1, ed. MJ Dilworth, AR Glenn, pp. 259-91. Amsterdam: Elsevier.

Rostislavleva K., Soler N., Ohashi Y., Zhang L., Pardon E., Burke J.E., Masson G.R., Johnson C., Steyaert J., Ktistakis N.T., Williams R.L. (2015) Structure and flexibility of the endosomal Vps34 complex reveals the basis of its function on membranes. *Science* **350**, aac73651-aac736511

- Roux B., Rodde N., Jardinaud M.F., Timmers T., Sauviac L., Cottret L., Carrère S., Sallet E., Courcelle E., Moreau S., Debelle F., Capela D., de Carvalho-Niebel F., Gouzy J., Bruand C., Gamas P.** (2014) An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J* **77**, 817-37
- Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J.** (1999) Phloem long distance transport of CmNACP mRNA: Implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**, 4405-4419
- Saghai-Marroof M.A., Soliman K.M., Jorensen R.A., Allard R.W.** (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 8014-18
- Schmittgen T., y Livak K.** (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**, 1101- 1108
- Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D.J., Song Q., Thelen J.J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G.D., et al.,** (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **463**, 178-183
- Schmutz J.** (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* doi:10.1038/ng.3008
- Schu P.V., Takegawa K., Fry M.J., Stack J.H., Waterfield M.D., Emr S.D.** (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* **260**, 88-91
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E. Tsien R.Y.** (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-1572
- SIAP** (2014) Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera, Balanzas disponibilidad-consumo de productos agrícolas 2009-2013, SAGARPA [en línea], <http://www.siap.gob.mx/balanza-disponibilidad-consumo/>
- Sieberer B.J., Ketelaar T., Esseling, J.J., Emons A.M.** (2005). Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytologist* **167**, 711-719
- Simonsen A., y Tooze S.A.** (2009) Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* **186**, 773-782
- Singh S.P., Teran H., Munoz C.G., Takegami J.C.** (1999) Two cycles of recurrent selection for seed yield in common bean, *Crop Science* **39**, 391–397
- Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J.** (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact* **5**, 7
- Slessareva J.E., Routt S.M., Temple B., Bankaitis V.A., Dohlman H.G.** (2006) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* **14**, 191-203

- Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I.** (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol* **133**, 16-20
- Sprent J.I.** (2007) Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol* **174**, 11-25
- Stack J.H., Herman, P.K., Schu P.V., Emr S.D.** (1993) A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J* **12**, 2195–2204
- Stack J.H., y Emr S.D.** (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J Biol Chem* **16**, 31552-62
- Stack J.H., DeWald D.B., Takegawa K., Emr S.D.** (1995a) Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J Cell Biol* **129**, 321-34
- Stack J.H., Horazdovsky B., Emr S.D.** (1995b) Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 1-33
- Stenmark H., y Gillooly D.J.** (2001). Intracellular trafficking and turnover of phosphatidylinositol 3-phosphate. *Semin Cell Dev Biol* **12** (2), 193-9
- Stenmark H., Aasland R., Toh B.H., D'Arrigo A.** (1996) Endosomal localization of the Autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 24048–24054
- Stougaard J.** (2001) Genetics and genomics of root symbiosis. *Current opinion in Plant Biology* **4**, 328-335
- Suzuki K., Kirisako T., Kamada Y., Mizushima N., Noda T., Ohsumi Y.** (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* **20**, 5971-81
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.** (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739
- Taylor R.G., Walker D.C., McInnes R.R.** (1993) *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* **21** (7), 1677-8
- Thompson A.R., y Vierstra R.D.** (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 165-73
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-82

- Thumm M., Egner R., Koch B., Schlumpberger M., Straub M., Veenhuis M., Wolf D.H.** (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **349**, 275-280
- Trinick M.J.** (1973) Symbiosis between *Rhizobium* and the non-legume, *Trema aspera*. *Nature* **244**, 459-460.
- Tsukada M., y Ohsumi Y.** (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169-174
- Turgeon B.G., y Bauer W.D.** (1985) Ultrastructure of infection-thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* **163**, 328-49
- Udvardi M., y Poole P.S.** (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 781-805
- Valdes-Lopez O., Arenas-Huertero C., Ramirez M., Girard L., Sanchez F., Vance C.P., Reyes J.L., Hernandez G.** (2008) Essential role of MYB transcriptionfactor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus deficiency signalling in common bean roots. *Plant Cell Environ* **31**, 1834-1843
- Van de Velde W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Nagy A., Tiricz H., Satiat-Jeunemaître B., Alunni B., Bourge M., Kucho K., Abe M., Kereszt A., Maroti G., Uchiumi T., Kondorosi E., Mergaert P.** (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**, 1122-6
- Van De Wiel C., Norris J.H., Bochenek B., Dickstein R., Bisseling T., Hirsch A.M.** (1990) Nodulin Gene Expression and ENOD2 Localization in Effective, Nitrogen-Fixing and Ineffective, Bacteria-Free Nodules of Alfalfa. *Plant Cell* **2**, 1009-1017
- van Spronsen P.C., Gronlund M., Pacios Bras C., Spaink H.P., Kijne J.W.** (2001) Cell biological changes of outer Cortical root cells in early determinate nodules. *Mol. Plant Microbe Int* **14**, 839-847
- Vanbrussel A.A.N., Bakhuizen R., Vanspronsen P.C., Spaink H.P., Tak T., et al.** (1992) Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipooligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**, 70-72
- Vance C.K., Kang Y.M., Miller A.F.** (1997) Selective ¹⁵N labeling and direct observation by NMR of the active-site glutamine of Fe-containing superoxide dismutase. *J Biomol NMR* **9**, 201-6
- Vance C.** (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorous acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology* **127**, 391-397
- Vanhaesebroeck B., y Waterfield M.D.** (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* **253**, 239-254
- Vanhaesebroeck B., Guillermet-Guibert J., Graupera M., Bilanges B.** (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 329-341
- Vermeer J.E., van Leeuwen W., Tobena-Santamaria R., Laxalt A.M., Jones D.R., Divecha N., Gadella T.W. Jr., Munnik T.** (2006) Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. *Plant J* **47**, 687-700

Vessey J. K. (1994) Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defence of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil* **158**, 151–162

Villalobos E. (2006) *Fisiología de producción de los cultivos tropicales*. 1ª. Ed. Sn José Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. ISBN 9968-936-05-7

Vlasova A., Capella-Gutierrez S., Rendon-Anaya M., Hernandez-Onate M., Minoche A.E., Erb I., Camara F., Prieto-Barja P., Corvelo A., Sanseverino W., Westergaard G., Dohm J.C., Pappas G.J., Jr., Saburido-Alvarez S., Kedra D., Gonzalez I., Cozzuto L., Gomez-Garrido J., Aguilar-Moron M.A., Andreu N., Aguilar O.M., Garcia-Mas J., Zehnsdorf M., Vazquez M.P., Delgado-Salinas A., Delaye L., Lowy E., Mentaberry A., Vianello-Brondani R.P., Garcia J.L., Alioto T., Sanchez F., Himmelbauer H., Santalla M., Notredame C., Gabaldon T., Herrera-Estrella A., Guigo R. (2016) The genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biology* **17**, 32

Volinia S., Dhand R., Vanhaesebroeck B., MacDougall L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin J., Panaretou C., Waterfield M. D. (1995) A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J* **14**, 3339–3348

Walker E., Perisic O., Ried C., Stephens L. Roge L., William R. (1999) Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* **402**, 313-320

Welters P., Takegawa K., Emr S.D., Chrispeels M.J. (1994) AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proceed of the Natl Acad of Sci of the USA* **91**, 11398-11402

Willems A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* **287**, 3-14

Wurmser A.E., Gary J.D., Emr S.D. (1999) Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *J Biol Chem* **274**, 9129-32

Wurmser A.E., y Emr S.D. (2002) Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy. *J Cell Biol* **158**, 761–772

Xie Z., y Klionsky D.J. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **10**, 1102-9

Xie Z., Nair U., Klionsky D.J. (2008) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**, 3290-3298

Xue H.W., Chen X., Mei Y. (2009) Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *The Biochemical Journal* **421**, 145-156

Yang W.C., Horvath B., Hontelez J., van Kammen A., Bisseling T. (1991) *In situ* localization of *Rhizobium* mRNAs in pea root nodules: nifA and nifH localization. *Mol Plant Microbe Interact* **4**, 464-468.

Zhang Y., y Akhtar R.A. (1998) Epidermal growth factor stimulates phospholipase D independent of phospholipase C, protein kinase C or phosphatidylinositol-3 kinase activation in immortalized rabbit corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* **3**, 294-300

Zhang Y., Li, S., Zhou L.Z., Fox E., Pao J., Sun W., Zhou C., McCormick S. (2011) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* PTEN caused accumulation of autophagic bodies in pollen tubes by disrupting phosphatidylinositol 3-phosphate dynamics. *The Plant Journal* **68**, 1081–1092

Zhuang X., Wang H., Lam S.K., Gao C., Wang X., Cai Y., Jiang L. (2013) A BAR-domain protein SH3P2, which binds to phosphatidylinositol 3-phosphate and ATG8, regulates autophagosome formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 4596-4615

Zhuang X., Jiang L. (2014) Autophagosome biogenesis in plants: roles of SH3P2. *Autophagy* **10** (4), 704-5

APÉNDICE

Anexo 1. Alineamiento usado para generar el árbol filogenético de la Figura 16

Homo sapiensMGRKHIIYSCDIDINQLKGSLECKREQKYKAVLEDPMLKFSGLYQET.CS.....VTCQFAEAKPLA	67
Mus musculusMGRKHIIYSCDIDINQLKGSLECKREQKYKAVLEDPMLKFSGLYQET.CS.....VTCQFAEAKPLA	67
Drosophila melanogasterMDQHFVYIHSSSHEKVIQVGTLECKRQPYEKLEDPILRFSGLYSEE.HPSFQVRLQVNRQRVTC	68
Dictyostelium discoideumMKKLEFVSSDPIKYKIYACTLECKRNKEVDKWDIDPYLKYSYSSLRDT.TI.....YVITLIVSDQKOLS	67
Nicotiana glaucaMAEPTSV.....VLSVSDIQLDRLVGGVYRPLASDGR.....L.....SFSFQVSSVQVPLT	63
Chlamydomonas reinhardtiiMVGTAAPVGRSRSASDINLVVRYVSELELLPAAVGAGAGGGGGVGGVGGV.GTVVPLGHDATVPTSS	74
Zea maysMVGGDNEF.....SCDSSSHLAFVNLHAGH.....ILLTDQK.VPEVECKKIVDGIQV	94
Oryza sativa Japonica Group (Isoform 1)MANGF.....SCDSSSLAFVVDRLHYPVTPPT.....SPPQDCTTLATNKK.VPEVVECKKIVDGIQV	66
Hordeum vulgare subsp. vulgare	MAAAAAGVSRVSAAGASSTF.....SCDSSSLAFVRLQAPIP.....PPAQ.....DGLDKK.VS.....VECKKIVDGIQV	71
Triticum urartu	MAARFVVDHARVGEKQSTKVVHMEFSSSSTIAEIVTAVGARR.....QRAARLRRHGLDKK.VS.....VECKKIVDGIQV	75
Arabidopsis thalianaMGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSSDSGVVSTAEK.KPEVVECKKIVDGIQV	64
Brassica napusMGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSTDSGVVSTAEK.KPEVVECKKIVDGIQV	64
Glycine max (Root Isoform)MGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	65
Glycine max (Nodule Isoform)MGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	64
Phaseolus vulgarisMGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	64
Medicago truncatulaMGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	60
Nicotiana tabacumMGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	65
Solanum lycopersicumMGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	65
Vitis viniferaMKEMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	67
Populus trichocarpaMGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	59
Amborella trichopodaMRGDSLRTGQVDDGAELEADPYEMLQHLITAAQ.....LFIYNGDSSSEKR.SAEVVECKKIVDGIQV	70
Physcomitrella patensMGMDF.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....KSPDLNENAPVTRERLEGNLPPV.....KPEVVECKKIVDGIQV	62
Oryza sativa Japonica Group (Isoform 2)MPSAPDEAQAQV.....H.....SCDSSSLAFVVDRLHYPVTPPT.....TLLIERS.APVVECKKIVDGIQV	62
Saccharomyces cerevisiaeMSLWNIH.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....PSQKILNPELMLIGSNVFP.SS.....HSLQVDRRRLIT	67
Candida albicansMATLSQQSATTG.....SCDSSNSVTRERLEGNLPPV.....CTRNWVLSKTFEPTVFKKLSQLYK.NS.....VIRWDRNLLIS	74
Aspergillus oryzaeAFTHASVQDQDFVQVYKGSLECKKQKE.VSILLKRPDLRHLSGVQNP.TS.....VTVQNSKQKPLC	64
Neosartorya fischeriAFTHASVQDQDFVQVYKGSLECKKQKE.VSILLKRPDLRHLSGVQNP.TS.....VTVQNSKQKPLC	64
Talaromyces marneffeiAFTHASVQDQDFVQVYKGSLECKKQKE.VSILLKRPDLRHLSGVQNP.TS.....VTVQNSKQKPLC	64
Trametes versicolorAFTHASVQDQDFVQVYKGSLECKKQKE.VSILLKRPDLRHLSGVQNP.TS.....VTVQNSKQKPLC	65
Schizosaccharomyces pombe consensusVFSVCFPSKYTARFLVYFIEYDQSEP.CICTIQ.....LFSGMESGSLMQKCVS.....K	51
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*		
Homo sapiens	LVVRSYKAFSTRMREWIKPVKYPKPRMAGALVLDVYGPVAVYDGTVSLGKYGMFQGMHDKVWPNVKADGSEPTK	152
Mus musculus	LVVRSYKAFSTRMREWIKPVKYPKPRMAGALVLDVYGPVAVYDGTVSLGKYGMFQGMHDKVWPNVKADGSEPTK	152
Drosophila melanogaster	LVVRSYKAFSTRMREWIKPVKYPKPRMAGALVLDVYGPVAVYDGTVSLGKYGMFQGMHDKVWPNVKADGSEPTK	153
Dictyostelium discoideum	TSEHISYNPFVSNKDETFIFPLHQDLPFSAIVIVLDCSGITTYVQVSSKCKDGMFQGMHDKVWPNVKADGSEPTK	152
Nicotiana glauca	TAISITAAALYQGSVDVSTIFFPLVYRDSAEAWLEIMVDAARDIREVTRAFNDESSLRGQRMFLETHGVIAKEA	137
Chlamydomonas reinhardtii	AAATAAAAAATTAATAACAPLQYDFAAAAAADAACLEGAAATAAGGSAAAGSSPGDSTAVVVEAAVRRREALV	159
Zea mays	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	139
Oryza sativa Japonica Group (Isoform 1)	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	151
Hordeum vulgare subsp. vulgare	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	156
Triticum urartu	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	160
Arabidopsis thaliana	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	148
Brassica napus	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	149
Glycine max (Root Isoform)	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	150
Glycine max (Nodule Isoform)	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	149
Phaseolus vulgaris	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	149
Medicago truncatula	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	145
Nicotiana tabacum	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	150
Solanum lycopersicum	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	160
Vitis vinifera	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	152
Populus trichocarpa	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	144
Amborella trichopoda	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	155
Physcomitrella patens	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	147
Oryza sativa Japonica Group (Isoform 2)	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	147
Saccharomyces cerevisiae	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	138
Candida albicans	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	151
Aspergillus oryzae	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	149
Neosartorya fischeri	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	149
Talaromyces marneffei	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	149
Trametes versicolor	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	148
Schizosaccharomyces pombe consensus	LVVREPSGPKYQVLELSTVYRDLTSLVLAFTVWDSSGGMVGGATVFLNNKQKLTGOKLQVLPKQKADGVPPT	133
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*		

Homo sapiens	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	486
Mus musculus	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	486
Drosophila melanogaster	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	487
Dictyostelium discoideum	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	488
Micromonas sp.	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	488
Chlamydomonas reinhardtii	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	472
Zea mays	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	477
Oryza sativa Japonica Group (Isoform 1)	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	487
Hordium vulgare subsp. vulgare	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	494
Triticum urartu	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	498
Arabidopsis thaliana	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	486
Brassica napus	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	486
Glycine max (Root Isoform)	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	488
Glycine max (Nodule Isoform)	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	487
Phaseolus vulgaris	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	486
Medicago truncatula	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	483
Nicotiana tabacum	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	488
Solanum lycopersicum	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	490
Vitis vinifera	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	482
Populus trichocarpa	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	493
Aspergillus oryzae	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	486
Physconitrella patens	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	484
Oryza sativa Japonica Group (Isoform 2)	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	481
Saccharomyces cerevisiae	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	484
Candida albicans	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	488
Aspergillus oryzae	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	478
Necassartorya fischeri	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	478
Talaromyces marneffei	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	478
Trametes versicolor	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	472
Schizosaccharomyces pombe	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	481
consensus	FLVSRACKSTLANLYVYVIVECEBQDQDQDPKHEMYLNVVRFSSQ.ALLKGDKSVRVRSLLAAQDTFVDRVHMMAVQR	

Homo sapiens	ESQNRKKKRRQALG.EKMNLSDEVLPLEPQVVKRGTETATLFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	569
Mus musculus	ESQNRKKKRRQALG.EKMNLSDEVLPLEPQVVKRGTETATLFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	569
Drosophila melanogaster	EPQNRKKKRRQALG.EKMNLSDEVLPLEPQVVKRGTETATLFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	572
Dictyostelium discoideum	MNITREKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	581
Micromonas sp.	MRGQPKKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	581
Chlamydomonas reinhardtii	SRKAAKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	556
Zea mays	VRGSAQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	562
Oryza sativa Japonica Group (Isoform 1)	VRGSAQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	572
Hordium vulgare subsp. vulgare	TRGNAEKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	579
Triticum urartu	TRGNAEKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	583
Arabidopsis thaliana	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	571
Brassica napus	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	571
Glycine max (Root Isoform)	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	573
Glycine max (Nodule Isoform)	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	572
Phaseolus vulgaris	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	571
Medicago truncatula	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	568
Nicotiana tabacum	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	572
Solanum lycopersicum	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	573
Vitis vinifera	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	576
Populus trichocarpa	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	567
Aspergillus oryzae	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	578
Physconitrella patens	VRGNTQKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	571
Oryza sativa Japonica Group (Isoform 2)	VHDAQTGRILEQ.FSGFSELKNSPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	566
Saccharomyces cerevisiae	K.DTTAKKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	585
Candida albicans	SNEATAKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	566
Aspergillus oryzae	SRDNRLLKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	563
Necassartorya fischeri	ARETRPLKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	563
Talaromyces marneffei	SENRAVKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	563
Trametes versicolor	SDPRPKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	556
Schizosaccharomyces pombe	FRGTRLKRIEKLRLG.EYKDLSDFPPLPFDPEYIKIVMRTSDFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	585
consensus	ESQNRKKKRRQALG.EKMNLSDEVLPLEPQVVKRGTETATLFRSALMGAQFREDCKYPPFPRKDDLRDDQL	

