



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN**

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DE *PvNIN* EN  
*PHASEOLUS VULGARIS* DURANTE SU SIMBIOSIS CON  
*RHIZOBIUM TROPICI* Y *RHIZOPHAGUS IRREGULARIS***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS**

**P R E S E N T A:**

**ALMA LETICIA AGUIRRE ALCALÁ**



**TUTOR: Dra. Kalpana Nanjareddy**

**ASESOR: Dr. Manojkumar Arthikala**

**LEÓN, GUANAJUATO**

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimientos

Estudiar esta carrera ha sido muy diferente a lo que pensé. Simplemente nunca podría haber imaginado como es que sería. Pero sin duda, ha sido un fantástico recorrido, posible gracias a mucha gente, y a todo lo que es mi amada UNAM. Es por ello que quiero agradecer a mi universidad, que no solo me dio la oportunidad de realizar mi carrera, sino que incluso me apoyo mediante la DGOAE, con diversas becas: Manutención, PAPIIT y de Titulación. Me hizo crecer académicamente y como persona. Estoy muy orgullosa de haber estudiado en la UNAM y formado parte de tan maravillosa comunidad, ahí conocí a grandes personas a las que también quiero agradecer.

Agradezco primero que nada a los coordinadores y creadores de esta carrera, pues es más que obvio que de no ser por ellos esto no habría sido posible. A todos mis profesores, que además de ser excelentes académicos son estupendas personas, por transmitirme sus conocimientos y amor por la ciencia en cada una de sus clases. A mi tutora, la Dra. Kalpana Nanjareddy y a mi asesor, el Dr. Manojkumar Arthikala. Ellos son los verdaderos merecedores del reconocimiento por la creación y resultados de este proyecto. Me adoptaron como aprendiz mucho antes del inicio de este trabajo. A ellos les debo toda la experiencia real y práctica en investigación, fueron mis guías y se los agradezco sobremanera.

Pero, está travesía inicio mucho antes de siquiera considerar formar parte de esta máxima casa de estudios, pues siempre tuve la convicción de obtener un título universitario. Lo anterior, por el gusto de continuar aprendiendo y creciendo en diversos aspectos; pero en gran medida, por todos aquellos que siempre han creído en mí, me han apoyado y sobre todo me han dado ejemplo de superación. Cada uno de ellos, mis seres queridos, forma parte de lo que soy. Familia y amigos... ¡muchas gracias, los adoro!

Ya en la universidad, conocí a mis compañeros y amigos. Que si bien, son todos más jóvenes que yo, jamás me sentí fuera de tono, al contrario, hicieron más llevaderos los días pesados. Siempre fuimos un grupo muy unido, quizá por los pocos que fuimos, y creamos un ambiente de impulso, apoyo y contraste de ideas. También gracias a ustedes, fue increíble compartir esta experiencia.

Por otro lado, hubo quién siempre estuvo desde el proceso de selección y hasta la fecha. Con un plato de comida al regresar a casa, escuchando como estuvo mi día, dándome ánimos para continuar y sobretodo siendo mi ejemplo y motor. Mami y papi, los amo. Muchísimas gracias, son personas excepcionales y me siento muy orgullosa de ustedes.

También hubo quién siempre me acompañó en las partes más densas de sacar a flote una carrera, lidiando con mi estrés, ayudándome a estudiar, escuchando mis quejas sobre lo difícil pero también lo increíble que era y comprendiendo si es que no podíamos vernos o mejor aún, estando a mi lado (dormido si es que le ganaba el sueño) mientras yo hacía mis tareas. Mi amor, te quiero muchísimo. Gracias por tanto.

# Contenido

<b>Glosario .....</b>	<b>6</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>9</b>
1.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	9
1.2 Micorrizas.....	11
1.3 Rhizobia .....	12
1.4 Ruta de Señalización Simbiótica Común .....	13
1.5 NIN .....	15
1.6 Secuencias de regulación génica .....	16
1.7 Frijol es recalcitrante.....	16
1.8 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	17
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo principal.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>19</b>
<b>4. Justificación.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Antecedentes .....</b>	<b>20</b>
5.1 Generación de plantas de frijol compuestas.....	20
5.2 Estudio de promotores .....	21
5.3 Micorrización y genes asociados.....	21
5.4 Genes expresados específicamente durante nodulación .....	23
5.5 Genes candidatos a incluirse en la ruta simbiótica común .....	24
5.6 Papel de NIN en micorrización .....	26
5.7 Expresión de NIN en <i>P. vulgaris</i> silvestre en condiciones simbióticas .....	27

<b>6. Métodos y materiales</b> .....	<b>27</b>
6.1 Diseño de oligos e identificación de la secuencia del promotor del gen NIN .....	27
6.2 Análisis de la secuencia de pNIN .....	28
6.3 Aislamiento de DNA genómico de <i>P. vulgaris</i> .....	28
6.4 Amplificación del promotor de NIN .....	28
6.5 Clonación del fragmento pNIN en el vector pENTR/D-TOPO .....	28
6.6 Clonación del promotor de NIN en el vector destino .....	29
6.7 Transformación de <i>E. coli</i> y/o <i>A. rhizogenes</i> con el vector final pBGWFS7.0/pNIN-EV .....	29
6.8 Esterilización y germinación de semillas .....	30
6.9 Material biológico y sistema de inducción de hairy roots .....	30
6.10 Inducción de hairy roots mediante la inyección de <i>A. rhizogenes</i> .....	30
6.11 Inoculación de las plantas compuestas con organismos simbiotes .....	31
6.12 Tinción con Trypan blue para evaluación de micorrización .....	31
6.13 Ensayo de tinción con GUS:X-gluc .....	31
6.14 Contrateñido con safranina .....	32
6.15 Análisis de los patrones de expresión y verificación de la colonización .....	32
<b>7. Resultados</b> .....	<b>32</b>
7.1 Identificación y análisis de pNIN .....	32
7.2 Aislamiento y clonación del promotor de NIN en fusión con GUS mediante el sistema Gateway. ....	36
7.3 Análisis de los patrones de expresión espacio-temporal del promotor de NIN durante la simbiosis de <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Rhizophagus irregularis</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	38
<b>8. Discusión</b> .....	<b>48</b>
8.1 Análisis del promotor de NIN .....	49
8.2 Expresión del promotor de NIN es específica para estructuras simbióticas durante simbiosis rizobial	50
8.3 Promotor de NIN se expresa en respuesta a la inoculación de micorriza en <i>Phaseolus</i> .....	51
<b>9. Conclusiones</b> .....	<b>52</b>
<b>10. Productos generados</b> .....	<b>52</b>
10.1 Artículos publicados .....	52
10.2 Congresos .....	53

<b>11. Bibliografía .....</b>	<b>53</b>
<b>12. Anexos .....</b>	<b>69</b>
12.1 Figuras .....	69
12.2 Tablas .....	71
12.3 Secuencia .....	73

## Glosario

AMF: Arbuscular Mycorrhiza Fungi → Hongo Micorrízico Arbuscular

AON: Autoregulation of Nodulation → Autoregulación de la Nodulación

CSSP: Common Symbiotic Signaling Pathway → Ruta de Señalización Simbiótica Común

LOC: Lipoquitoligosacárido

MF: Myc Factors → LOCs producidos por AMF que se unen a RLKs

NF: Nod Factors → LOCs producidos por la *Rhizobium* que se unen a RLKs

NIN: Nodule Inception → Gen marcador de nodulación

PAM: Periarbuscular Membrane → Membrana Periarbuscular

PBM: Peribacterial Membrane → Membrana Peribacteriana

PM: Plasma Membrane → Membrana Plasmática Vegetal

pNIN: Promotor del gen NIN

PPA: Prepenetration Apparatus → Aparato de Pre-penetración

RLK: Receptor Like Kinase → Receptor de Membrana Vegetal

TF: Transcription Factor → Factor de Transcripción

d: días

dpi: días post inoculación

her: hifa extra radical

hi: hilo de infección

hip: hipopodio

kb: kilobases

nj: nódulo joven

nm: nódulo maduro

pn: primordio de nódulo

pr: pelo radicular

rl: raíz lateral

vn: vasculatura de nódulo

vr: vasculatura radicular

zd: zona de diferenciación

ze: zona de elongación

zm: zona meristemática

## Resumen

La micorrización arbuscular es una simbiosis íntima y antigua encontrada entre la mayoría de plantas terrestres y hongos de la familia Glomeromycota. Más tarde a lo largo de la evolución, se llevó a cabo el establecimiento de la nodulación entre plantas leguminosas y bacterias del suelo conocidas colectivamente como rizobia. Este, en ese entonces, nuevo tipo de simbiosis involucró distintos genes de la ruta de señalización que previamente estaban implicados en micorrización. El dialogo químico entre los dos simbiontes en leguminosas es transmitido a través de un conjunto de genes, lo cual es conocido como Ruta de Señalización Simbiótica Común (Common Symbiotic Signaling Pathway o CSSP) o ruta SYM. La mayoría de los genes pertenecientes a esta CSSP fueron identificados en nodulación.

El gen Nodule Inception (NIN) es el primer gen caracterizado genéticamente por su papel en la regulación del proceso de nodulación en *Lotus japonicus*. NIN se encuentra implicado en múltiples procesos, tales como, respuestas simbióticas en pelos radicales, formación de hilos de infección e inducción de división celular en el córtex. No se han realizado avances similares para dilucidar el papel de NIN en relación con la simbiosis micorrízica arbuscular.

En la presente investigación, hemos documentado los patrones de expresión espacio-temporales de PvNIN en *Phaseolus vulgaris* durante su interacción simbiótica con *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus irregularis*. El promotor PvNIN se expresó en la zona de diferenciación de la raíz, en pelos radicales con hilos de infección y en células corticales que se dividen para desarrollar un primordio de nódulo radicular. En nódulos jóvenes y maduros, la expresión se registró en tejidos vasculares y en todo el nódulo, respectivamente. Las raíces de *P. vulgaris* inoculadas con hongo micorrízico arbuscular mostraron un aumento en la actividad de NIN en respuesta a dicha inoculación y adicionalmente, se encontró expresión en células colindantes al hipopodio e hifa intra y extracelular. Nuestros estudios muestran que NIN en *Phaseolus vulgaris* podría poseer un rol esencial en ambos tipos de simbiosis, nodulación y micorrización.

# 1. Introducción

Debido al enorme incremento poblacional en los últimos y próximos años, se ha convertido un reto abastecer de alimentos a la población mundial, pues la agricultura enfrenta diversas dificultades para generar un rendimiento óptimo (Brown & Kane, 1995; Ehrlich & Ehrlich, 1990; Godfray et al., 2010; Meadows et al., 1992; Rosegrant & Cline, 2003; Tscharntke et al., 2012). Entre esas dificultades se encuentran, cambio climático, escasez de agua por contaminación de mantos acuíferos (por agroquímicos, por ejemplo), erosión, expansión de las zonas rurales, entre otras (FAO, 2011; FAO & ITP, 2015; Rosegrant & Cline, 2003).

Dentro de las soluciones para aminorar estos problemas, además de la biotecnología, se encuentra la agricultura sustentable, en la que el uso de biofertilizantes tiene un papel importante (Rao, 1982; Sharma et al., 2010). Los inóculos empleados como biofertilizantes suelen ser microorganismos simbiotes que ayudan a los cultivos a captar nutrientes antes no disponibles, además de mejorar la fertilidad del suelo (Gianinazzi & Schüepp, 1994; Johansson et al., 2004; Legocki et al., 1996; Solaiman et al., 2014).

Las plantas leguminosas poseen un alto contenido nutrimental, esto debido a la capacidad que poseen para desarrollar los dos tipos de simbiosis más importantes, la nodulación y la micorrización. La leguminosa más importante a nivel de consumo es *Phaseolus vulgaris*, mejor conocida como frijol común.

## 1.1 *Phaseolus vulgaris*

La presente investigación y experimentación se llevó a cabo en la planta leguminosa *Phaseolus vulgaris*, mejor conocida como frijol común, dado su importancia descrita a continuación. Se describe además, sus características principales y limitaciones como modelo de estudio.

### Clasificación y biología general

El frijol común es una planta leguminosa que pertenece al orden *Fabales*, Familia *Fabaceae*, Género *Phaseolus*, Especie *Phaseolus vulgaris* (OECD, 2016). Para una identificación fácil de los miembros del género *Phaseolus*, una de las características que los distinguen de toda la familia de fabáceas, es la quilla de sus flores (dos pétalos fusionados) que termina en curva (B.D. et al., 1977; Purseglove, 1987). Sus flores pueden ser moradas, rosas o blancas y la estructura de las mismas favorece la auto-polinización (B.D. et al., 1977).

Sin embargo, una de las posibles razones por la cual *Phaseolus vulgaris* no es empleada ampliamente como planta modelo en estudios que conllevan etapas de desarrollo avanzadas, es que crece como planta anual (en climas templados y tropicales), pero también puede crecer como planta semiperene (en climas tropicales) (Purseglove, 1987), lo que implica mucho tiempo desde la germinación hasta la floración, por ejemplo.

Por otro lado, existe una gran diversidad de cultivares de la especie, las cuales poseen diferencias en sus características morfológicas y agronómicas, tales como, hábitos de crecimiento, tamaño y color de semilla (Singh et al., 1991). Esta diversidad ha sido posible gracias a los esfuerzos en materia de fitomejoramiento. De igual manera, el tiempo de maduración de la semilla varía ampliamente según las condiciones ambientales y dependiendo del cultivar del que se trate, va de 50 a más de 250 días (Singh et al., 1991).

En este sentido, si bien, la planta de frijol no es un modelo adecuado para estudiar procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, puede ser empleada para evaluar otro tipo de mecanismos (ver abajo).

### **Importancia alimenticia**

De las más de 1000 especies de leguminosas, solo cerca de 20 son utilizadas para el consumo humano en forma de grano seco (Hayat et al., 2014; Velasco-González et al., 2013). *Phaseolus vulgaris* es la leguminosa más importante en la alimentación humana, especialmente en países en vía de desarrollo, pues posee gran cantidad de nutrientes entre los que destacan las proteínas (hasta 3 veces más que en cereales). Pero además, es rica en carbohidratos, aminoácidos, fibra, minerales y vitaminas (Broughton et al., 2003; de Almeida et al., 2006; Hayat et al., 2014; Kutoš et al., 2003; Nyau, 2014; Siddiq et al., 2010; Velasco-González et al., 2013). Y aunque su contenido de metionina y cisteína es bajo, estos pueden ser complementados en la dieta con cereales como lo son el maíz o arroz (Broughton et al., 2003; Wortmann, 2006).

En países como Brasil y México, representa la primera fuente de proteína de la dieta humana, principalmente en comunidades de pocos recursos (Broughton et al., 2003). Pero es en México, donde además de poseer valor nutrimental, posee un gran valor socio-cultural e histórico, pues es centro de origen y diversificación del frijol (Gepts & Debouck, 1991; Kaplan & Lynch, 1999) y era consumido desde tiempos remotos por sus ancestros (Riva Palacio et al., 1999).

## Interacciones simbióticas

La planta de frijol es capaz de establecer asociaciones simbióticas con microorganismos, como hongos micorrízicos arbusculares al igual que más de 80% de las plantas (Goltapeh et al., 2008) y con rizobia (término empleado para referirse en plural a bacterias del género *Rhizobium*), como cualquier leguminosa (y unas pocas plantas no leguminosas). La importancia agrícola de las leguminosas radica en estas asociaciones que le brindan una biofertilización (fósforo proporcionado por el hongo y nitrógeno por parte de la bacteria), aumentando su valor nutricional, siendo las proteínas producto del nitrógeno brindado, las más representativas como ya se mencionó (Broughton et al., 2003).

### 1.2 Micorrizas

Los hongos micorrízicos arbusculares (Arbuscular Mycorrhiza Fungi o AMF) o micorrizas son organismos simbiotes que se asocian a las raíces de la mayoría de las plantas superiores (Smith et al., 1997). Esta asociación es una simbiosis antigua, que se cree, ayudó a las plantas a colonizar la tierra (Pirozynski & Dalpe, 1989; Pirozynski & Malloch, 1975; Remy et al., 1994; Simon et al., 1993; Smith et al., 1997; Taylor et al., 1995). Además de ser una asociación antigua, se encuentra ampliamente distribuida pues estos hongos se encuentran presentes en casi cualquier suelo, ya sea agrícola o no; y en ocasiones, en gran proporción en relación a otros microorganismos (Olsson et al., 1999).

La simbiosis de micorriza con una planta, es una asociación mutualista que le brinda a la planta beneficios que van desde el incremento en el crecimiento (Smith et al., 1997), hasta conferirle resistencia a estrés biótico y abiótico (Goltapeh et al., 2008; Newsham et al., 1994; Subramanian et al., 1995). Los beneficios ya mencionados pueden ser meramente secundarios, ya que el principal beneficio o función desempeñada por el hongo en esta asociación es la formación de redes hifales a lo largo de las raíces para brindarle a la planta una mayor toma de agua y nutrientes no móviles como el fósforo (Jakobsen, 1999), mientras que la planta provee de carbohidratos al hongo (Smith et al., 1997).

Aunque para la planta no es vital desarrollar esta simbiosis, pues puede tomar (quizá de manera deficiente) los nutrientes presentes en el suelo o agregados en forma de fertilizante, para los hongos micorrízicos arbusculares sí lo es, pues éstos son biótrofos obligados, de forma que dependen de dicha colonización para poder completar su ciclo de vida (Goltapeh et al., 2008).

Para que la colonización del hongo en la planta sea satisfactoria y pueda desarrollarse la simbiosis, deben llevarse a cabo distintas etapas que son principalmente: germinación de la espora, diferenciación a hifas, formación del aparato de pre-penetración (PPT), formación del hipopodio, penetración en la raíz, crecimiento intercelular, formación de membrana periarbuscular, formación de arbusculos y transporte de nutrientes (Goltapeh et al., 2008). Son los arbusculos y la membrana periarbuscular que los rodea (PAM), el sitio principal de intercambio de nutrientes con la membrana plasmática vegetal (PM), puesto que es en estas zonas que se sitúan los transportadores de fósforo, al menos para la simbiosis de *M. truncatula* con *G. versiforme* o *G. gigantea* (Harrison et al., 2002).

Desde una perspectiva molecular, debe de llevarse a cabo la liberación de estrigolactonas por parte de la planta. Las estrigolactonas son un grupo de sesquiterpenos lactonas, las cuales son percibidas por el hongo provocando la ramificación de hifas (Akiyama et al., 2005), la producción y adhesión de factores Myc (lipoquitiligosacaridos o Myc-LOCs) a receptores de membrana de la planta, proceso por el cual se activan los genes subsecuentes en la ruta de micorrización (M. Banba et al., 2008).

### 1.3 Rhizobia

Las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* son fijadoras de nitrógeno atmosférico que desarrollan una simbiosis mutualista con leguminosas, proporcionándole a la planta dicho nutriente y recibiendo de ella carbohidratos (Glyan'ko, 2015; Mylona et al., 1995).

Para que esta interacción se lleve a cabo debe existir primero una comunicación precisa entre hospedero y simbionte. Dicha comunicación conlleva la liberación de flavonoides por parte de la planta (Goethals & Montagu, 1992). Los flavonoides son detectados por la bacteria y la atraen a los pelos radiculares de la raíz, desencadenando la producción de factores Nod (Nod factors o NF) (Fisher & Long, 1992). Los NF al igual que los factores Myc (Myc factors o MF) son lipoquitiligosacáridos del simbionte. Los NF se unen a receptores de membrana Quinasas Tipo Receptor (Receptor-Like Kinases o RLK) de la leguminosa, presentes en la epidermis radicular (Ferguson et al., 2010; Glyan'ko, 2015; Mylona et al., 1995). Esta unión genera, entre otros cambios, oscilaciones en la concentración de calcio que son detectadas por la proteína CCaMK, desencadenando la expresión de genes nodulin (genes involucrados en la organogénesis del nódulo), entre ellos NIN (Kammen, 1984; Mylona et al., 1995), para la progresión de la nodulación.

El proceso de desarrollo del nódulo (órgano fijador de nitrógeno) consta de distintas etapas principales: unión de la bacteria a un pelo radical, deformación del pelo radical y encapsulamiento de la bacteria, formación del hilo de infección, división de células corticales, progresión del hilo de infección dentro de la raíz, desarrollo del primordio de nódulo, invasión de la bacteria dentro del primordio de nódulo,

diferenciación a bacteroide, maduración del nódulo y fijación de nitrógeno (Ferguson et al., 2010; Mylona et al., 1995).

El primer cambio estructural, luego de la unión de la bacteria a la raíz, es la deformación del pelo radicular, así como el inicio de división de células corticales (Bhuvaneshwari & Solheim, 1985; Calvert et al., 1984). Es mediante esa deformación del pelo radicular que una porción de bacteria (colonia) es encapsulada e ingresa por la punta de esta raíz emergente con la ayuda de enzimas que degradan la pared celular (Callaham & Torrey, 1981). Una vez dentro, forma un hilo de infección mediante repetidos ciclos de re-síntesis y re-digestión de la matriz extracelular, a la vez que continúa proliferando, creando así, presión de empuje para la progresión de la infección dentro del córtex de la raíz (Gage, 2004).

A la par del ingreso de la bacteria, la presencia de los NF permanece estimulando la división de células corticales, formando una pequeña protuberancia cerca de las células radiales del xilema, mejor conocido como primordio de nódulo. Es hacia este primordio de nódulo que se dirige el hilo de infección. Una vez que el hilo de infección se ha introducido hasta las células del córtex que forman el primordio de nódulo, la bacteria se libera dentro del citoplasma. Luego se da lugar a un proceso por el cual la bacteria es recubierta por una membrana derivada de la planta llamada membrana peribacteroide (Peribacterial Membrane o PBM), y en conjunto, bacteria y PBM forman lo que se conoce como simbiosoma (Udvardi & Day, 1997).

Por último, las bacterias dentro del simbiosoma se diferencian a bacteroides para formar un nódulo maduro capaz de fijar nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio (Roth & Stacey, 1989). Se ha reportado que el inicio (desde la unión de factores a los receptores de membrana hasta la detección y la progresión de la señal de oscilaciones de calcio por las proteínas CCaMK y CYCLOPS) de esta ruta es también activada por hongos micorrízicos arbusculares (M. Banba et al., 2008; Ferguson et al., 2010).

#### **1.4 Ruta de Señalización Simbiótica Común**

Los procesos simbióticos de las plantas tanto con rhizobia como con micorrizas, comparten la misma ruta simbiótica inicial, llamada Ruta de Señalización Simbiótica Común (Common Symbiotic Signaling Pathway o CSSP) (Mari Banba et al., 2008). Los genes responsables de la activación de las etapas tempranas tanto de la nodulación como de la micorrización, son llamados genes SYM (symbiotic genes) (Manchanda & Garg, 2007). Los genes SYM han sido identificados mediante el uso de leguminosas mutantes que exhiben deficiencia en el desarrollo de la nodulación y que al mismo tiempo presentan afectación en la colonización por micorrizas (Genre & Russo, 2016).

Existen grandes diferencias entre cada una de estas simbiosis, como lo es el desarrollo de un órgano nuevo (nódulo) para el establecimiento de la bacteria, proceso que no ocurre para la invasión del hongo. No obstante, la nodulación y la micorrización comparten otras características.

Un ejemplo de similitud es la liberación de compuestos vegetales (flavonoides o estrigolactonas) detectados por el microorganismo (Akiyama et al., 2005; Goethals & Montagu, 1992), los cuales generan la subsecuente liberación de factores simbióticos (Nod o Myc). Dichos factores son reconocidos a su vez por la planta para iniciar los cambios necesarios para que se lleve a cabo la respectiva simbiosis (M. Banba et al., 2008; Fisher & Long, 1992; Mylona et al., 1995).

Otra característica compartida es que, aunque ambos simbiosis ingresan al interior de la planta hasta las células corticales e incluso hasta la vasculatura vegetal, poseen una membrana perisimbiótica que les provee aislamiento físico del citoplasma de células vegetales y mediante la cual se realiza el intercambio de nutrientes entre hospedero y simbiote (Provorov et al., 2002). Esta membrana se sitúa alrededor de los bacteroides en la simbiosis fijadora de nitrógeno, y en los arbusculos en la de carácter fúngico.

Por otro lado, existen también similitudes a nivel molecular. En las leguminosas modelo *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*, se han reportado al menos siete genes pertenecientes a la CSSP (M. Banba et al., 2008; Francia et al., 2011). Dichos genes están implicados en las primeras etapas del desarrollo de sus respectivas estructuras simbióticas. Y son principalmente proteínas para la transducción de señales iniciadas por los factores simbióticos. SYMRK, CASTOR, POLLUX, NUP85, NUP133, CCaMK y CYCLOPS (nombres para las proteínas en *Lotus japonicus*) son los genes SYM hasta ahora identificados en estas plantas (M. Banba et al., 2008; Manchanda & Garg, 2007; Venkateshwaran et al., 2013).

SYMRK es un receptor quinasa con repeticiones ricas en leucina (leucin-rich repeat receptor-like kinase o LRR-RLK), que tiene por función la percepción de los factores simbióticos liberados por los microorganismos, para luego generar señales o flujo de calcio (Markmann et al., 2008; Yoshida & Parniske, 2005). CASTOR y POLLUX son canales de cationes situados en la membrana nuclear de la célula vegetal que podrían estar involucrados con la transducción de las señales de calcio desde el citoplasma hasta el núcleo (Imaizumi-Anraku et al., 2005).

De igual manera, las proteínas NUP85 y NUP133 son nucleoporinas que forman parte del nucleoporo, y se ha especulado que también poseen un papel importante en el transporte de las señales de calcio hacia el interior del núcleo (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007). Por otro lado, una vez generadas las oscilaciones de calcio dentro del núcleo, la proteína CCaMK es la encargada de descifrar dicha señal (Koninck & Schulman, 1998) e interactuar con CYCLOPS (Messinese et al., 2007), proteína que posteriormente activa las redes o cascadas de genes que darán lugar a cualquiera de las dos simbiosis involucradas en esta ruta, dependiendo de la señal recibida y transmitida por CCaMK.

Además de los considerados genes SYM, recientemente se ha determinado que los factores de transcripción NSP1 y NSP2, involucrados en la regulación de la expresión de genes de nodulación, también son miembros importantes para el establecimiento de la micorrización (Lauressergues et al., 2012; Maillet et al., 2011; Messinese et al., 2007).

## 1.5 NIN

El gen NODULE INCEPTION (NIN) pertenece a la familia de proteínas NLPs (NIN-like proteins) las cuales se caracterizan por poseer un dominio RWP-RK relacionado con el desarrollo controlado por nitrógeno, además contiene un dominio PB1 que le confiere la capacidad de unirse al ADN (Delgado-Sánchez & Saucedo-Ruiz, 2006). De manera que NIN codifica para un factor de transcripción y éste actúa río abajo de NSP1 y 2, controlando la nodulación en sus etapas tempranas, como lo son el desarrollo de hilos de infección y primordios de nódulos, expresándose únicamente en condiciones de nodulación (Stougaard et al., 1999).

Lo anterior podría ser el resultado de que NIN induzca a la proteína NPL (Nodulation Pectate Lyase), que es requerida para la infección rizobio-bacteriana en la epidermis vegetal (Xie et al., 2012). Además, genes que codifican para distintas subunidades del Factor Nuclear Y (NF-Y), NF-YA1 y NF-YA2 son sitios de unión de NIN y a ambos, factor de transcripción y sitios de unión, se les ha relacionado con división de células corticales necesarias para la formación de nódulos (Takashi Soyano et al., 2013).

Se ha demostrado también que NIN tiene función represora sobre el gen ENOD11 (early nodulin 11), uno de los genes nodulin expresados luego de la percepción de los factores Nod y que es elemento clave en la nodulación (Delgado-Sánchez & Saucedo-Ruiz, 2006). En etapas posteriores, NIN también tiene un papel importante en la Autoregulación de la Nodulación (Autoregulation Of Nodulation o AON) controlando el número de nódulos a través de la inducción de péptidos CLE (CLAVATA3/ESR) como señal, llamada señal Q (Ferguson et al., 2010; T Soyano et al., 2014).

Las distintas funciones descritas para este factor de transcripción, se han estudiado y encontrado en leguminosas modelo como *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*. Sin embargo, su función en leguminosas de importancia agrícola no ha sido evaluada.

## 1.6 Secuencias de regulación génica

El promotor de un gen es una secuencia de ADN no codificante localizada río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Su función radica en la regulación de la expresión del gen que precede, debido a que en él se unen la ARN polimerasa y los factores de transcripción necesarios para que ello ocurra. Un promotor consta de dos elementos principales, el Promotor Central y el Promotor Proximal (Nature Education, 2014; SCFBio).

El Promotor Central es la secuencia mínima de promotor necesaria para el inicio adecuado de la transcripción. Esta sección del promotor contiene sitios de unión para factores de transcripción generales. En eucariontes, este contiene la caja TATA, donde la proteína de unión TATA se adhiere para participar en la formación del complejo transcripcional de ARN polimerasa. La caja TATA, se encuentra generalmente entre los nucleótidos -25 y -50, con respecto al sitio de inicio de la transcripción (SCFBio).

El Promotor Proximal es un poco más extenso, situándose aproximadamente hasta el sitio -250 con respecto al sitio de inicio de la transcripción, y contiene sitios de unión a factores de transcripción específicos (SCFBio).

El estudio de un promotor en fusión con un gen reportero puede dilucidar los patrones de expresión espacio-temporales que determina dicho promotor sobre el gen sobre el cual actúa naturalmente. El conocimiento generado, luego, puede ser aplicado ya sea para continuar estudiando su mismo gen o puede emplearse para fusionar ese promotor con algún otro gen que se desee siga los mismos patrones de expresión que establece, teniendo un enorme potencial en biotecnología (Machray et al., n.d.; Patent Lens).

## 1.7 Frijol es recalcitrante

Una manera de dilucidar los patrones de expresión de NIN en frijol durante su simbiosis con micorriza o *Rhizobium*, sería a través de la generación de plantas transgénicas, en las cuales se clone el promotor de dicho gen en fusión con un gen reportero. Sin embargo, transformar una planta de frijol completa podría generar dificultades en la etapa de regeneración de la planta o problemas de reproducibilidad (Christou, 1997).

Los casos en los que se ha logrado transformar miembros del género *Phaseolus* suelen no ser repetibles o no son aplicables para frijol (Hnatuszko-Konka et al., 2014). Incluso existen protocolos de regeneración que funcionan para muchas de las especies del género *Phaseolus*, pero no para *P. vulgaris* (Delgado-Sánchez & Saucedo-Ruiz, 2006).

De los principales problemas identificados para regenerar a una planta de frijol *in vitro*, se encuentra el factor edad, es decir, la edad de la plántula de la que se tomaron los explantes. Mientras más joven sea (7 días aprox.), es menos probable que haya perdido la capacidad de regenerarse (Hnatuszko-Konka et al., 2014; Veltcheva & Svetleva, 2005). Esta cuestión fácilmente podría solucionarse, pero al parecer no es el único factor afectando.

### **1.8 *Agrobacterium rhizogenes***

La alternativa más adecuada, sería la generación de plantas compuestas, es decir, con raíces transgénicas y parte área normal (silvestre), mediante la generación de hairy roots inducidas por la infección e integración de material genético de *A. rhizogenes* (Nanjareddy et al., 2017).

En la naturaleza, esta bacteria es la responsable de generar en diversas plantas dicotiledóneas, una enfermedad (hairy root disease) cuyo principal síntoma es el desarrollo de múltiples “hairy roots”, las cuales son raíces delgadas y pequeñas (de ahí su nombre) que surgen en la parte aérea de la planta a partir del tallo, específicamente en el sitio de infección de *Agrobacterium rhizogenes*, en respuesta a la integración de la copia de un fragmento de genoma de la bacteria invasora en la célula vegetal (Chandra, 2012; Chilton et al., 1982; Stewart et al., 1900).

A dicho fragmento se le denomina ADN de transferencia (transfer DNA o T-DNA) y proviene del plásmido de virulencia Ri (Gelvin, 2009). Este plásmido consta de diversos genes que codifican proteínas que desempeñan funciones como: conjugación, síntesis y catabolismo de opinas, así como de iniciación, transferencia e integración del T-DNA (Chandra, 2012). Además de inducir la generación de raíces, la integración del T-DNA induce la síntesis de las ya mencionadas opinas, las cuales son compuestos de carbón de bajo peso molecular y que sirven de alimento a la bacteria (Estrada-Navarrete et al., 2006; Petit et al., 1983). Existen cuatro tipos de plásmidos Ri en *A. rhizogenes* y se clasifican dependiendo del tipo de opina que sintetizan y son agropina, mannopina, cucumopina y mikimopina (Estrada-Navarrete et al., 2006; Savka et al., 1990).

La cepa K599 es empleada en plantas leguminosas (como la soya (*Glycine max*)) que han exhibido dificultad en la transformación mediante otras cepas de *Agrobacterium*, pues posee una mejor generación de hairy roots (Mankin et al., 2007). Esta cepa contiene el plásmido Ri del tipo cucumopina (Estrada-Navarrete et al., 2006; Savka et al., 1990) que a su vez solo posee un fragmento de T-DNA (Combard et al., 1987; Estrada-Navarrete et al., 2006).

Este mecanismo natural de transformación genética se ha adaptado como una herramienta más de genómica funcional, principalmente en plantas recalcitrantes como lo es el frijol (Estrada-Navarrete et al., 2006). Cabe mencionar, que el tipo de estudios que utilizan esta técnica de transformación solo sirven para generar conocimiento a nivel de las raíces generada por *A. rhizogenes*, puesto que la parte foliar y raíces inducidas por la planta permanecen siendo silvestres.

Para poder implementar dicho proceso natural para la determinación de conocimiento de un gen en específico, es necesario transformar mediante electroporación a la cepa de *A. rhizogenes* elegida con la construcción de interés. Si además de ello se requieren estudios especializados en algún tema, como en este caso la evaluación de los patrones de expresión de un gen durante su simbiosis con rhizobia y micorriza, debe de existir la certeza mediante estudios previos y preeliminares de que es posible dicha colonización para garantizar que el comportamiento de expresión se deba a la presencia del simbionte. En este sentido, existe evidencia de que plantas leguminosas compuestas pueden ser colonizadas tanto por rhizobia como por micorriza (Estrada-Navarrete et al., 2006; Nanjareddy et al., 2017; Oldroyd, Harrison, & Udvardi., 2005).

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo principal**

Analizar los patrones de expresión del promotor del gen NIN en hairy roots de *Phaseolus vulgaris* durante su simbiosis con *Rhizophagus irregularis* y *Rhizobium tropici*.

### **2.2 Objetivos específicos**

Para lograr el objetivo general del proyecto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación y análisis del promotor de NIN.
2. Aislamiento y clonación del promotor de NIN en fusión con GUS mediante el sistema Gateway.
3. Análisis de los patrones de expresión espacio-temporal del promotor de NIN durante la nodulación de *Phaseolus vulgaris* por *Rhizobium tropici*.
4. Análisis de los patrones de expresión espacio-temporal del promotor de NIN durante la micorrización de *Phaseolus vulgaris* con *Rhizophagus irregularis*.

### 3. Hipótesis

PvNIN forma parte de la Ruta de Señalización Simbiótica Común y por lo tanto posee un papel importante tanto en nodulación, como en micorrización.

### 4. Justificación

Nodule inception (NIN) es un factor de transcripción que actúa río abajo de la Ruta de Señalización Simbiótica Común. Como la mayoría de los otros genes simbióticos, NIN se encuentra bien caracterizado por su papel funcional durante nodulación en *L. japonicus* y *M. truncatula*. Se sabe que NIN tiene un papel esencial durante las respuestas simbióticas en pelos radiculares, la formación de hilos de infección y la organogénesis del nódulo. Sin embargo, la función de NIN durante micorrización está menos explorada y uno de los reportes disponibles sugiere que NIN perjudica la invasión fúngica pero puede no afectar la formación arbuscular en *L. japonicus* (Guillotin et al., 2016). No obstante, el papel funcional de NIN en nodulación y micorrización en *P. vulgaris* no ha sido estudiado previamente.

Además, la inserción de construcciones promotor-gen reportero, a través del sistema de generación de plantas compuestas brinda la capacidad de monitorear la localización tejida específica y subcelular de proteínas en diversos orgánulos (Marjamaa et al., 2006). En particular, el promotor del gen NIN no ha sido estudiado ni en leguminosas modelo ni en ninguna otra planta. Conocer los patrones de expresión que induce el promotor de NIN puede hablarnos más acerca de las funciones que posee este gen.

Por lo tanto, el presente trabajo se enfoca en la identificación, aislamiento y análisis de los patrones de expresión espacio-temporal del promotor PvNIN durante la simbiosis rizobiana y micorrízica en hairy roots de *P. vulgaris*.

## 5. Antecedentes

### 5.1 Generación de plantas de frijol compuestas

Como ya se mencionó, *A. rhizogenes* es la responsable de enfermar una amplia variedad de plantas, desarrollando múltiples “hairy roots”. Biotecnológicamente, dichas raíces inducidas por *A. rhizogenes*, son atractivas dada su capacidad para crecer rápidamente *in vitro* sin la adición de ninguna fitohormona (Tepfer & Tempé, 1981; Willmitzer et al., 1982). Por lo anterior, es que se han adoptado como una herramienta biotecnológica empleada ampliamente para la producción de metabolitos secundarios o proteínas recombinantes, principalmente (Veena & Taylor, 2007).

Dichas “hairy roots” han sido empleadas, además, en estudios de interacción planta-simbionte o planta-patógeno (Christey, 2001). Su capacidad para producir las proteínas foráneas deseadas está determinada por la inserción del ADN deseado (que codifica la proteína de interés) en la posición del ADN de transferencia dentro del plásmido Ri. Aunque a la fecha esta tecnología se ha empleado experimentalmente en una gran variedad de especies y para distintos fines de investigación por muchos años, no siempre se contó con las bases técnicas ahora disponibles (Veena & Taylor, 2007). Se tuvo que pasar por distintas dificultades para el desarrollo de las mismas. Un ejemplo de ello es la ya mencionada recalcitrancia de especies del género *Phaseolus*, lo cual impulsó el empleo de hairy roots en el estudio de estas.

Sin embargo, derivado del protocolo desarrollado por Estrada-Navarrete et al. (2007), para generar plantas compuestas del género *Phaseolus*, es que se abrió paso a una alternativa de transformación/investigación para estas especies de gran interés. Y con ello, han surgido diversos trabajos que citan y emplean dicho protocolo. Estos trabajos van desde el estudio de controles epigenéticos en el desarrollo de nodulación (Barraza et al., 2018), hasta la develación de mecanismos de silenciamiento por microRNAs y su represión ante condiciones de estrés por déficit de agua en especies de este género (De la Rosa et al., 2018). Así mismo, existen otros trabajos en distintas especies (Plasencia et al., 2016). Otro factor importante para el aumento en el uso de esta biotecnología fue el desarrollo de herramientas moleculares complementarias, haciendo del sistema de generación de plantas compuestas mediante hairy roots, una opción más para el estudio de genes específicos.

## 5.2 Estudio de promotores

Existen diversos enfoques para los que se han desarrollado herramientas moleculares y protocolos, los cuales ampliaron el uso de hairy roots (Veena & Taylor, 2007). Entre ellos se encuentran: estudios de genómica funcional mediante genética reversa que emplean herramientas de silenciamiento por ARN de interferencia (RNA interference o RNAi); estudios de interacciones planta-agente biótico, planta-agente abiótico; y construcciones gen reportero-promotor para monitorear localización subcelular del transcrito y analizar los patrones de expresión del promotor evaluados.

Esta última derivación de la herramienta permite la selección de hairy roots transgénicas o el descarte de las no transgénicas mediante la incorporación en el plásmido Ri de genes reporteros expresados constitutivamente, los cuales brindan un distintivo visual (Collier et al., 2005).

Por otro lado, es posible determinar los patrones de expresión. Es decir, examinar dónde o cuándo se expresan los productos de un gen. Lo anterior se logra fusionando promotores con genes reporteros, tales como GUS o GFP e insertando esta construcción en la posición T-DNA del plásmido de *A. rhizogenes* (Isayenkov et al., 2005; Suttipanta et al., 2007)

## 5.3 Micorrización y genes asociados

Es evidente que entre la lista de genes asociados a micorrización se encuentran los genes pertenecientes a la CSSP, los cuales son necesarios para la progresión de esta simbiosis principalmente en su etapa temprana por su función de señalización o de ingreso a células de la epidermis (Gutjahr & Parniske, 2013). En concordancia con esto, mutantes de *L. japonicus* para cada uno de los siete genes de esta ruta mostraron intentos fallidos de ingreso a la planta (Kistner et al., 2005). Presentando incluso, muerte celular de la célula vegetal infectada y del hongo invasor, en el caso de la mutante *castor* (Novero et al., 2002). Por otro lado, en las mutantes *symrk* y *ccamk*, no hubo formación del aparato de pre-penetración (PPT) (Genre et al., 2005).

Sin embargo, existen entre este conjunto de genes unos más indispensables que otros. Pues la formación del arbusculo parece no estar afectada en mutantes de SYMRK, CASTOR, POLLUX, NUP85 y NUP133, una vez que las células de epidermis han sido invadidas por el hongo (Demchenko et al., 2004; Kistner et al., 2005; Wegel et al., 1998). Mientras que no es así en leguminosas modelo mutantes de CCaMK y CYCLOPS, suponiendo que estos poseen también un papel imprescindible en el ingreso a células corticales durante la

micorrización (Yano et al., 2008). A diferencia del resto de genes que, en etapas tardías, quizá pueden ser reemplazados por algún otro mecanismo.

En adición a los genes de la CSSP, diversos estudios han determinado un conjunto de genes o secuencias que se encuentran conservados en plantas capaces de desarrollar micorrización y/o expresados específicamente durante la misma; entre los que se encuentran RAM1, RAM2, VAPYRIN, STR1, STR2 y PT4 (Gutjahr & Parniske, 2013; E. Wang et al., 2012). Los genes mencionados poseen funciones determinadas y en etapas específicas, como formación del aparato PPT, inducción del hipopodio, ramificación y maduración de arbúsculo (Gutjahr & Parniske, 2013).

Los promotores *SbtM1* (subtilisin M1) y *Bcp1* (blue copper-binding protein 1) parecen actuar en etapas tempranas del establecimiento de la micorrización. Más específicamente, están involucrados en la formación del aparato PPT, puesto que en *L. japonicus* las células que poseen el aparato PPT están marcadas por su activación (Kistner et al., 2005; Takeda et al., 2012).

RAM1 (Required for Arbuscular Mycorrhiza 1) es un factor de transcripción GRAS que se une al promotor de RAM2 promoviendo su expresión. RAM2 codifica para una glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), una enzima biosintética de lípidos implicada en la producción de monómeros de cutina (E. Wang et al., 2012). *Medicago truncatula* mutada en el gen RAM2 es incapaz de ser colonizada por hongos micorrízicos arbusculares. Lo anterior sugiere su importancia en la formación del hipopodio. Este fenotipo se restaura luego de la adición exógena de los ácidos grasos alifáticos C16 precursores de cutina (E. Wang et al., 2012). Se ha determinado también que GPAT está involucrado en la ramificación del arbúsculo, puesto que los pocos casos de ingreso fúngico en células corticales de mutantes *ram2* produjeron arbúsculos atrofiados (E. Wang et al., 2012).

Mutantes *vapyrin* mostraron una completa ausencia de arbúsculos, al igual que las ya mencionadas *ccamk* y *cyclops*, lo que revela la importancia de VAPYRIN en la progresión del hongo. Por otro lado, *vapyrin/pam1* sí presenta ingreso del hongo en células corticales, pero estas resultan únicamente en protuberancias hifales intracelulares sin ramificaciones importantes, es decir, pocas ramificaciones de hifas gruesas (etapa birdsfoot), evidenciando la falta de maduración del arbúsculo (Pumplin et al., 2010; Reddy DMR et al., 2007). Adicionalmente, SRT1 y SRT2 transportadores ABC de tamaño medio, son también importantes para la maduración (ramificación adecuada) del arbúsculo ya que su mutación genera un arresto en la etapa birdsfoot (Zhang et al., 2010). Se ha predicho por analogía con otros transportadores ABC que exportan una pequeña molécula al espacio periarbuscular (Gutjahr et al., 2012).

En etapas tardías, una vez formados el arbúsculo y su membrana periarbuscular, se presentan PT4 y otras proteínas asociadas a las membranas PAM y PM o a la interface de intercambio entre hongo y planta (Gutjahr & Parniske, 2013). PT4 es otro gen expresado específicamente durante este tipo de simbiosis, que

incluso es empleado como gen marcador para esta condición. Codifica para un transportador de fosfato (Phosphate Transporter 4). Y su mutación o silenciamiento causa niveles bajos de colonización y un mayor número de arbusculos atrofiados (Javot et al., 2007; Yang et al., 2012).

#### **5.4 Genes expresados específicamente durante nodulación**

Las funciones asignadas a cada uno de los genes pertenecientes a la ruta simbiótica común han surgido luego de estudios realizados en nodulación, puesto que es en esta área que está la mayor concentración de investigación e información sobre simbiosis (Genre & Russo, 2016). Por lo tanto, las funciones de los genes SYM en nodulación son las ya especificadas anteriormente.

Sin embargo, la ruta simbiótica común implica únicamente la primera etapa (señalización y reconocimiento de señal) de la nodulación. Luego de este reconocimiento entre leguminosa y bacteria, actúan muchos otros genes para el ingreso de *Rhizobium* y el desarrollo del nódulo. En esta sección describiremos algunos de los más importantes.

Entre ellos se encuentran una serie de factores de transcripción como NSP1 (nodulation signaling pathway 1) y NSP2, cuya función se encuentra después de que CCaMK decodifica las oscilaciones de calcio, pues las mutantes *nsp1* y *nsp2* no muestran afectaciones en este mecanismo. Aunado a lo anterior, se ha visto que existe una co-localización de estos factores de transcripción con CCaMK, lo que podría significar que NSP1 y NSP2 son activados directamente río abajo de CCaMK. Y justamente río arriba de la acción de genes ENOD (early nodulin), pues NSP1 se une al promotor de ENOD11 con la ayuda de NSP2 para que este se exprese. Y *nsp1* y *nsp2* son incapaces de activar la transcripción de estos genes en epidermis, sitio donde actúa ENOD11 (Catoira et al., 2000).

Se ha visto que ERN1 (Ets2 repressor factor (ERF) required for nodulation 1), otro factor de transcripción, también se une al promotor del gen ENOD11 para promover su expresión (Andriankaja et al., 2007). Además, NSP1 se une al promotor de éste y al de un factor de transcripción más, NIN, develando una pequeña parte de este complejo sistema de regulación de los genes ENOD (Hirsch et al., 2009).

Luego de la señalización y progresión de la infección en células de epidermis, podría ser que CCaMK induce el aumento en los niveles de citoquininas, las que a su vez se unen a un receptor ubicado en células corticales de la raíz para dar paso a la formación de primordios de nódulo mediante la división de este tipo de células (Ferguson et al., 2010). Este receptor contiene un dominio histidin quinasa (HK) codificado por el gen HK1 en *Lotus japonicus* (CRE1 en *Medicago truncatula*) (Gonzalez-Rizzo et al., 2006).

Mutaciones que sobre expresan (de ganancia de función) este gen provocan una división de células corticales controlada, resultando en nodulación espontánea (Tirichine et al., 2007). Lo mismo sucede en mutaciones de ganancia de función de CCaMK, mostrando también su importancia en la progresión de la infección en células corticales (Gleason et al., 2006). Mientras que por el contrario, mutaciones de pérdida de función de HK1 muestran infección de *Rhizobia* en células de epidermis pero no presentan formación de primordios y por ende el número de nódulos disminuye significativamente (Murray et al., 2007).

En esta etapa de simbiosis también son necesarios NSP1 y NSP2. Pues aún con ganancia de función de CCaMK, si estos dos pierden su función, no se muestra el fenotipo de división de células corticales ni nodulación espontánea (Gleason et al., 2006; Tirichine et al., 2007). Por último, como ya se mencionó, NIN funge como regulador positivo en la expresión de genes ENOD junto con una red compleja de factores de transcripción en epidermis. Sin embargo, se ha visto que en las mutantes *nin* ocurre una sobreexpresión del gen ENOD11, lo cual sugiere que NIN actúa como represor de dicho gen (Delgado-Sánchez & Saucedo-Ruiz, 2006). NIN además, al igual que PT4 en micorrización, es un gen marcador de nodulación y que está relacionado en la formación de hilos de infección, división de células corticales y por tanto en la formación de primordios de nódulo (Stougaard et al., 1999).

## 5.5 Genes candidatos a incluirse en la ruta simbiótica común

Anteriormente se pensaba que eran mecanismos biológicos del simbiote los que facilitaban el ingreso al hospedero, con enzimas de degradación de la pared celular, por ejemplo (Gage, 2004). Pero gracias a diversos estudios en leguminosas modelo mutantes en un solo gen, que presentaban afectación o abolición de ambos tipos de simbiosis, es que se determinó que existe una comunicación previa con el hospedero y que este permite e incluso colabora en el ingreso del simbiote (Kistner et al., 2005). Por estos mismos estudios, es que se estableció que estas simbiosis comparten una ruta inicial y los genes involucrados en ella (Manchanda & Garg, 2007; Oldroyd, 2013).

Dentro de los genes pertenecientes a la CSSP están incluidos al menos siete genes (Kistner et al., 2005). No obstante, recientemente se ha descubierto que genes que se creían específicos de nodulación, también poseen un papel en micorrización, y viceversa. De igual manera, esta lista se ha ampliado indagando en los genes relacionados a los ya incluidos. Uno de ellos, que en cierta literatura ya se considera miembro de esta ruta es otra nucleoporina llamada NENA (Groth et al., 2010).

Otro gen implicado en ambas simbiosis es HMGR1 (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa 1), enzima biosintética de mevalonato (MVA) que se creía que solo tenía un papel durante nodulación (Ferguson et al., 2010), y cuya proteína forma un complejo con SYMRK y proteínas receptoras específicas en cada tipo de simbiosis (proteínas NFR en nodulación y CERK en micorrización) para la transferencia de la señal recibida al núcleo (Kevei et al., 2007; Miyata et al., 2014).

Hay incluso un trabajo en el cual se muestra que si bien se diferencian las proteínas receptoras de los factores para las distintas simbiosis, es posible que un dominio quinasa de la proteína receptora CERK puede conducir a nodulación de igual manera que el dominio quinasa de la proteína receptora NFR, sugiriendo que NFR evolucionó a partir de CERK, es decir, que el proceso de nodulación evolucionó a partir de la micorrización (Miyata et al., 2014).

Lo anterior podría estar ampliamente relacionado con un dominio de lectina de una apirasa implicada en el desarrollo de micorrizas y que se cree que actúa río arriba del enriquecimiento de calcio en la CSSP (Roberts et al., 2012). Esta apirasa se posiciona cerca de los receptores en la membrana plasmática lo que sugiere también su participación en la CSSP (Gutjahr & Parniske, 2013). También se ha determinado que los factores de transcripción NSP1 y NSP2, comúnmente considerados involucrados en la regulación de la expresión de genes de nodulación, participan en la regulación de síntesis de compuestos secundarios durante el establecimiento de la micorrización (Delaux et al., 2013; Laressergues et al., 2012; Maillet et al., 2011).

Por otro lado, la expresión del SbtM1 podría estar controlada directa o indirectamente por la vía de señalización común de simbiosis, pues ha sido inducido en ausencia de hongo micorrízico arbuscular por una construcción GOF-CCaMK (Takeda et al., 2012).

Luego de la acción e interacción de todas estas proteínas, factores de transcripción y promotores, principalmente a manera meramente de señalización, vienen los cambios estructurales que permiten el ingreso del simbionte y el desarrollo de sus estructuras simbióticas. Una estructura producida por la planta que de alguna manera se comparte en ambas simbiosis, es una membrana adicional a la citoplasmática vegetal, que recubre a los simbiontes dentro de la célula. Se trata de la membrana peribacteriana (Peribacterial Membrane o PBM) en el caso de nodulación y membrana periarbuscular (Periarbuscular Membrane o PAM) para micorrización. Ambas poseen un contacto directo con la membrana plasmática vegetal (Plasma membrane o PM) y de esta manera es posible el intercambio de señales y nutrientes (Gutjahr & Parniske, 2013).

Para formar esta interfaz durante micorrización, se requieren dos proteínas de membrana VAMP asociadas a vesículas exocíticas. Estas mismas proteínas son también necesarias para el desarrollo de simbiosomas durante el desarrollo de la nodulación en *M. truncatula*, corroborando una vez más la evolución de la nodulación a partir de la micorrización, en específico, la adopción de mecanismos existentes en micorrización como lo es la biogénesis exocítica para el desarrollo de la membrana perimicrobiana (Ivanov et al., 2012).

En este mismo contexto, otro gen potencialmente involucrado en la reorganización estructural de las células infectadas es VAPYRIN. Lo anterior se sabe ya que, en mutantes *vapyrin* de *Medicago*, la penetración del hongo en la raíz frecuentemente es abortada, y en los pocos casos en los que logra ingresar a células del córtex, se forman únicamente pequeñas protuberancias hifales o simplemente no se forman (Murray et al., 2011; Pumplin et al., 2010). De igual manera, este gen es candidato a pertenecer a la ruta simbiótica común, puesto que también se ha visto implicado en la formación de hilos de infección y en el desarrollo de la nodulación misma, en *Medicago* (Murray et al., 2011).

VAPYRIN se asocia con pequeños compartimentos subcelulares, potencialmente vesículas (Feddermann et al., 2010; Pumplin et al., 2010). Y aunque su estructura, las predicciones de secuencia y su localización sugieren que VAPYRIN posee una función estructural que implica interacciones de proteínas en membranas y/o en citoesqueleto durante la acomodación intracelular de los simbiosomas, su función precisa en simbiosis sigue sin estar clara (Feddermann & Reinhardt, 2011).

Dentro de esta creciente lista de genes compartidos en las rutas simbióticas, podría incluirse también al factor de transcripción NIN, que si bien forma parte de los genes conservados en plantas capaces de desarrollar nodulación, y es empleado como un marcador de dicha condición, eso no significa que no pueda jugar un papel importante también en micorrización (Stougaard et al., 1999). Su posición dentro de la ruta de nodulación, justo río abajo de la ruta simbiótica común y de los factores de transcripción NSP1 y NSP2, habla de su posible implicación en micorrización.

## 5.6 Papel de NIN en micorrización

Una vez iniciado el planteamiento de este proyecto y el desarrollo del mismo, no existía literatura que revelara la existencia de alguna investigación sobre la implicación de NIN en micorrización. Sin embargo, durante la experimentación se publicó un estudio de este tipo, en el que únicamente se evaluaron los niveles de expresión de NIN en presencia del AMF *Rizophagus irregularis* y de factores Myc-LCOs, así como el efecto en el desarrollo de micorriza en la mutante *nin* de *M. truncatula* (Guillot et al., 2016).

Los resultados en cuanto a niveles de expresión corroboraron los obtenidos previamente por la tutora de este trabajo (para el momento en que se publicó ya se contaba con ellos, ver apartado 5.7), en los cuales se ve un claro incremento en los niveles de expresión de NIN durante la presencia de *R. irregularis*, incluso mayor en nuestro caso que se llevó a cabo en *P. vulgaris*.

Por otro lado, la evaluación de micorrización en la mutante *nin* nos brindó una perspectiva acerca de la posible función de este factor de transcripción, puesto que, el número de puntos de infección y el porcentaje de colonización se vieron significativamente reducidos. No así, para la longitud de colonización, la cual, parece no verse afectada en esta mutante. Lo anterior indica que NIN podría tener un papel importante en la penetración del hongo a la raíz y no tanto en la colonización del mismo una vez ingresado.

### **5.7 Expresión de NIN en *P. vulgaris* silvestre en condiciones simbióticas**

La tutora de este proyecto realizó una evaluación de la expresión del gen NIN bajo la presencia de simbiosis y en su ausencia mediante PCR cuantitativo en tiempo real para determinar si existía una influencia de dichos microorganismos en la expresión del gen, previo a todos los experimentos propios del trabajo. Las raíces de *Phaseolus* inoculadas con *R. tropici* o *R. irregularis* mostraron inducción de los niveles de expresión del gen NIN en 4 y 6 veces más, respectivamente. Estos resultados indicaron un posible papel del gen NIN durante ambas interacciones simbióticas (Fig. A5).

## **6. Métodos y materiales**

### **6.1 Diseño de oligos e identificación de la secuencia del promotor del gen NIN**

La secuencia del gen NIN en *Phaseolus* (PvNIN) que previamente fue identificada (Nanjareddy et al., 2016) se empleó para obtener la secuencia del promotor PvNIN mediante su análisis por BLAST en Phytozome v12.1 (<http://www.phytozome.net>). Se tomaron 1 kb río arriba de la secuencia del gen. A partir de esta secuencia se diseñaron oligos que cubrieran distintas longitudes, tomando en cuenta las secciones indispensables del promotor, como la caja TATA y el sitio de inicio de transcripción. Dichos oligos se evaluaron con la herramienta en línea Oligo Evaluator (Sigma-Aldrich) (<http://www.oligoevaluator.com/>).

Luego del análisis de oligos se optó por elegir los que amplificaban un fragmento de 718 pb dada la estabilidad de los mismos.

## 6.2 Análisis de la secuencia de pNIN

Los sitios de unión para factores de transcripción se predijeron mediante la herramienta PlantRegMap (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/>) de la base de datos PlantTFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>). Dentro de la página de PlantRegMap se seleccionó la herramienta Binding Site Prediction y se procedió a analizar el promotor delimitando la búsqueda en la especie *Phaseolus vulgaris* y con un p-value  $\leq 1e-5$ . Mientras que para la predicción de la caja TATA se utilizó PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

## 6.3 Aislamiento de DNA genómico de *P. vulgaris*

Se aisló ADN genómico de puntas de raíces obtenidas de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. Negro jamapa) luego de ser germinadas dos días en oscuridad a 28 °C, usando DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 6.4 Amplificación del promotor de NIN

Usando los oligos específicos de pNIN, se amplificó un fragmento correspondiente a 718 pb. La mezcla de reacción y el programa de PCR empleados se muestran en la Tabla A1 y en la Fig. A1, respectivamente. La purificación de la banda en el gel de electroforesis se realizó con el kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction y se siguió el protocolo contenido.

## 6.5 Clonación del fragmento pNIN en el vector pENTR™/D-TOPO™

Antes de proceder a la clonación se empleó la enzima Blunting de Invitrogen con la cual se llevó a cabo una reacción para rellenar el extremo cohesivo CACC del fragmento pNIN, adicionándole su respectivo buffer, dNTPs y agua en proporciones según el protocolo del fabricante. Esta reacción se incubó a 70°C por 10 minutos y se pasó a hielo inmediatamente.

El fragmento del promotor de NIN aislado se clonó dentro del vector de entrada pENTR utilizando pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit de Invitrogen. La mezcla de la reacción fue: Fragmento pNIN (4 µL), NaCl (1 µL), Vector pENTR™/D-TOPO™ (0.5 µL) y H<sub>2</sub>O (0.5 µL) (Fig. A2). Se reservó a temperatura ambiente durante 16 horas.

De 5-6 µL de la mezcla de reacción pENTR/D-TOPO/pNIN se empleó para transformar células competentes de *E. coli* (TOP10) usando el método de choque térmico (Froger & Hall, 2007). Las colonias positivas se obtuvieron bajo la selección con Kanamicina 50 mg/L (Kan50). El plásmido pENTR/D-TOPO/pNIN fue aislado de las colonias positivas usando GeneElute™ Plasmid Miniprep (Sigma Aldrich), siguiendo el protocolo contenido.

El plásmido se envió para su secuenciación usando los primers M13 para asegurar la orientación correcta del inserto y también para descartar errores en el fragmento del promotor clonado.

## **6.6 Clonación del promotor de NIN en el vector destino**

El fragmento del promotor de PvNIN se amplificó a partir del plásmido pENTR/D-TOPO/pNIN usando los primers M13. El fragmento del promotor se clonó dentro del vector destino pBGWFS7.0 usando LR clonasa (ambos de Invitrogen) (Karimi et al., 2002). La mezcla de reacción consistió de 6 µL del fragmento pNIN, 5 µL del vector pBGWFS7.0 y 1 µL de LR clonasa, se dejó incubando durante 16 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo luego de agregar 1 µL de Proteínasa K la mezcla de reacción e incubarla a 37° C por 10 min.

## **6.7 Transformación de *E. coli* y/o *A. rhizogenes* con el vector final pBGWFS7.0/pNIN-EV**

La mezcla de reacción pBGWFS7.0/pNIN se transformó dentro de células competentes de *E. coli* (TOP10) por el método de choque térmico (Froger & Hall, 2007). Las colonias positivas fueron seleccionadas con Espectinomicina 200 mg/L (Spec200). Se llevó a cabo un PCR de colonia usando primers específicos del promotor para confirmar las clonas con los parámetros descritos en la Fig. A1 y sólo se cambió la primera etapa por una temperatura de 94° C por 10 minutos y para la correcta alineación de los oligos se disminuyó la T<sub>m</sub> a 55° C. Se eligieron dos colonias positivas para preparar stocks en glicerol.

Se transformó el plásmido pBGWFS7.0/pNIN dentro de células electrocompetentes de *Agrobacterium rhizogenes* K599. El plásmido pBGWFS7.0/EV (Empty Vector – vector vacío) también se transformó en células de *Agrobacterium rhizogenes* K599 para usarse como control. La transformación se llevó a cabo a un voltaje de 1.8 y se dejó en crecimiento por 2 días a 28°C. Para este vector el antibiótico de selección fue Espectinomicina 200 mg/L (Spec200). Las colonias positivas se resuspendieron en medio LB/Spec200 líquido y se plaquearon en cajas con medio LB/Spec200 nuevas. Para los stocks de células transformadas de *A. rhizogenes* se empleó la misma proporción 1:1 de células y glicerol al 80%. Se guardaron a -80° C.

## 6.8 Esterilización y germinación de semillas

Se esterilizaron aproximadamente 20 semillas de frijol (*P. vulgaris* cv. Negro Jamapa) en 50 mL de etanol al 96% por 1 min., se eliminó el etanol; luego se agregó 50 mL de cloro al 20% (hipoclorito de sodio) por 10 min, agitándose constantemente dentro de una campana de flujo laminar. Se removió el cloro y se enjuagó con suficiente agua estéril tres veces.

Se germinaron las semillas estériles en papeles filtro humedecidos con solución Broughton & Dilworth (B&D) (Broughton & Dilworth, 1971) por 2 días en oscuridad a 28 °C. La composición de la solución B&D se muestra en la Tabla A3.

## 6.9 Material biológico y sistema de inducción de hairy roots

Se plaquearon 200 µL de células transformadas de *A. rhizogenes* con el vector pBGWFS7.0/pNIN y pBGWFS7.0/EV previamente almacenados a -80° C. El sistema de inducción de hairy roots se preparó colocando un tubo de centrifuga de 15 mL dentro de uno de ensayo, conteniendo ambos solución nutritiva B&D. El tubo centrifuga se cubrió con aluminio perforado (para colocar dentro la raíz principal del frijol) y el tubo de ensayo con una tapa de plástico.

## 6.10 Inducción de hairy roots mediante la inyección de *A. rhizogenes*

Los cultivos de toda la noche a 28° C de *A. rhizogenes* albergando los plásmidos pBGWFS7.0/pNIN o pBGWFS7.0/EV se removieron de las cajas y se resuspendieron en una mínima cantidad de agua destilada estéril. Se inyectó el cultivo en los hipocótilos de las plántulas germinadas de dos días.

Las plántulas con hipocótilos inyectados se colocaron en el sistema y se crecieron a 28°C. Una vez que las hojas alcanzaron el borde del tubo, se les retiró la tapa y se les puso plástico para dejar salir las hojas y mantener el resto del sistema aislado. Se mantuvieron los niveles de B&D.

### **6.11 Inoculación de las plantas compuestas con organismos simbiotes**

Catorce días después de la aparición de las hairy roots, se seleccionaron las raíces transgénicas basándose en fluorescencia GFP. Las raíces no transformadas se removieron y las raíces principales (silvestres) se cortaron. Las plantas compuestas con hairy roots transgénicas se transfirieron a vasos con vermiculita estéril. En el caso de las plantas inoculadas con micorriza la vermiculita ya contenía un gramo de esporas de *R. irregularis* (conteniendo 10000 esporas/gr.) previamente mezclado. A la vermiculita para evaluación de nodulación se le agregó 1 mL de *Rhizobium tropici* diluida en agua estéril (crecimiento de una caja petri con medio PY (Tabla A3) en 10 mL de agua) una vez trasplantados los frijoles.

Las plantas para evaluar nodulación y las plantas control (no inoculadas) se regaron cada tercer día con solución nutritiva B&D, mientras que las plantas para analizar la colonización con micorriza, se regaron con B&D sin fósforo + KNO<sub>3</sub> 2mM también cada tercer día.

### **6.12 Tinción con Trypan blue para evaluación de micorrización**

Para la verificación de la colonización de *R. irregularis*, se realizó una tinción específica para hongos micorrízicos arbusculares, en la cual segmentos de raíces de 1 cm se hierven en KOH al 2% y se tiñen con TRYPAN BLUE al 0.05% (Saito et. al, 2007).

### **6.13 Ensayo de tinción con GUS:X-gluc**

Las plantas se removieron y limpiaron del sustrato. Las raíces (hairy roots) se cortaron en segmentos de 2 cm de largo y se colocaron en cajas petri con buffer GUS:X-gluc (Tabla A2), hasta quedar completamente sumergidas. Las cajas se cubrieron con aluminio para mantener la reacción en oscuridad y se incubó a 37 °C toda la noche y posteriormente se enjuagaron con agua estéril en tres ocasiones (Jefferson, 1987).

## **6.14 Contrateñido con safranina**

En las raíces de plantas inoculadas con *R. irregularis* se realizó un teñido adicional a la tinción histoquímica con GUS.X-gluc. Las raíces se tiñeron con una solución acuosa de safranina al 1 % durante 10 segundos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada hasta que no existiera coloración (Bandoni, 1979). Este contrateñido se realizó para visualizar simultáneamente la expresión de pNIN e hifas fúngicas.

## **6.15 Análisis de los patrones de expresión y verificación de la colonización**

Las raíces se colocaron en portaobjetos cuidando que no se posicionara ninguna encima de otra, se les colocó agua y se colocó un cubreobjetos. Para las muestras con nódulos, se agregó parafilm en los extremos de manera que el cubreobjetos quedara más separado del portaobjetos. Las muestras se visualizaron y analizaron en el microscopio óptico (Leica CTR5000, Alemania) bajo luz blanca y en microscopio estéreo modular (Leica MZ10 F, Alemania) bajo luz blanca o GFP-UV con una excitación de 488 nm y una fluorescencia de emisión de 510 a 540 nm. Las estructuras fúngicas también fueron observadas bajo el microscopio para determinar el porcentaje de colonización de la longitud de la raíz (% RLC) (McGonigle et al., 1990).

# **7. Resultados**

## **7.1 Identificación y análisis de pNIN**

### **Análisis de promotor del gen NIN (pNIN)**

El análisis del promotor de NIN en la base de datos PlantTFDB arrojó 30 sitios de unión de factores de transcripción de 9 familias (o dominios) de proteínas diferentes, AP2/ERF, B3, BBR-BPC, bHLH, C2H2, G2-like, GATA, MICK\_MADS y TCP (Peking University, 2010). La Tabla 1 muestra dichos sitios de unión de factores de transcripción enlistados de menor a mayor e-value. Al indagar en las funciones mediante sus términos GO descritos y en la literatura, muchos de ellos poseían implicación directa o indirecta con procesos de simbiosis.

Algunos de estos factores de transcripción se subrayaron en rojo pues sus funciones denotan su posible participación en ambos procesos de simbiosis. El primero pertenece a la superfamilia de proteínas AP2/ERF, que ha sido vinculada a regulación transcripcional de diversos procesos biológicos que están relacionados a crecimiento y desarrollo, así como a respuesta a estímulos ambientales (Peking University, 2010).

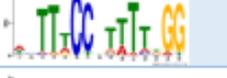
Sin embargo, los motivos de unión que reconocen ambas proteínas AP2/ERF, no son similares. Esto quizá debido a que pertenecen a distintas familias dentro de esta superfamilia. El primer factor de transcripción AP2/ERF en la tabla forma parte de la familia AP2, la cual posee dos dominios AP2/ERF. Dentro de PlantTFDB no se encontró mayor información descrita respecto a este FT predicho, ni dentro de su grupo de ortólogos.

Se tuvo que buscar en la literatura la posible implicación de esta familia en los procesos simbióticos aquí descritos, encontrándose únicamente relacionado a nodulación, en la que parece tener un papel de regulación negativa (Nova-Franco et al., 2015). A pesar de ello, su función en los procesos de simbiosis no está bien definida.

El segundo factor de transcripción AP2/ERF (el primero subrayado en rojo) pertenece a la familia de proteínas ERF que se caracteriza por contar con un solo dominio AP2/ERF y su participación durante simbiosis podría ser de manera indirecta, dado que participa en una amplia variedad de procesos biológicos, según su anotación en PlantTFDB. Entre las que se encuentra el desarrollo de raíces laterales (Peking University, 2010).

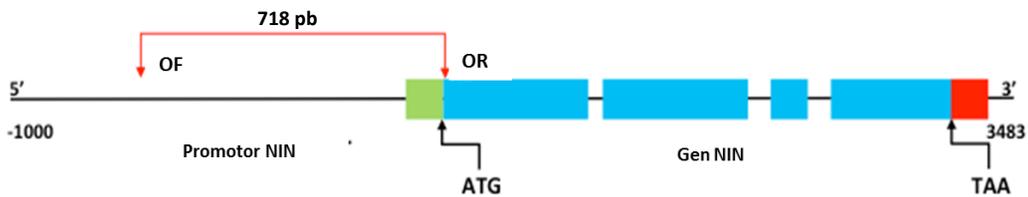
El último factor de transcripción de la Tabla 1, también subrayado con rojo es TCP. Esta familia de proteínas posee un dominio también llamado TCP que consta de una secuencia básica Hélix-Loop-Hélix (bHLH) de 59 aminoácidos que permite la unión al ADN y la interacción proteína-proteína (Martín-Trillo & Cubas, 2010). Su nombre deriva de cuatro proteínas en las cual se identificó este dominio y que parecían ser producto de genes no relacionados: tb1 (teosinte branched 1), CYC (CYCLOIDEA), PCF1 y PCF2 (PROLIFERATING CELL FACTORS) (Martín-Trillo & Cubas, 2010). Las funciones arrojadas por los términos GO asociados son: regulación del tamaño celular, desarrollo radicular y regulación negativa de la senescencia foliar (Peking University, 2010).

**Tabla 1 Sitios de unión a factores de transcripción localizados en el promotor de NIN**

ID	TF	Secuencia que reconoce	Incidencia	Función
Phvul.008G052000	AP2/ERF		1	Regulación negativa de la nodulación
Phvul.008G222400	AP2/ERF		1	Desarrollo de raíces laterales. Crecimiento de meristemo radical.
Phvul.001G086800	B3		1	Proliferación celular. Biosíntesis de ácido salicílico. Respuesta a auxinas.
Phvul.009G015000	BBR-BPC		8	Respuesta a etileno
Phvul.001G031300	bHLH		1	Inducido en presencia de micorriza.
Phvul.008G270400	C2H2		4	Expresión durante simbiosis fúngica
Phvul.011G124200	G2-like		2	Transducción de señal. Organización de organelos.
Phvul.008G254600	GATA		1	Expresión durante simbiosis fúngica
Phvul.002G147600	MICK_MADS		1	Diferenciación celular.
Phvul.005G035900	MICK_MADS		1	Respuesta a auxinas
Phvul.003G190900	TCP		6	Respuesta a citoquininas, ácido abscísico y giberelinas. Proliferación celular.
Phvul.010G089100	TCP		3	Desarrollo radicular. Respuesta de defensa.

### Diseño de oligos para amplificar el promotor del gen NIN (pNIN)

Los oligos se diseñaron río arriba de la secuencia codificante incluyendo la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción. El oligo forward debía contener en el extremo 5' la secuencia CACC, para que una vez obtenido el promotor pudiera ser insertado de forma dirigida en el vector de entrada pENTR/D-TOPO. Para dicho diseño se incluyeron dentro de la secuencia a amplificar sitios de unión a factores de transcripción mostrados en la Tabla 1. Los oligos finales se muestran en la Tabla 2. La secuencia a amplificar por tales oligos se representa en la Fig. 1.



**Fig. 1 Esquema de la estructura del gen NIN de *P. vulgaris*.** Una representación esquemática de la estructura del gen NIN que muestra 5'UTR (verde), 4 exones, 3 intrones y 3'UTR (rojo) en el cromosoma número 9 de *P. vulgaris*. Río arriba del codón de inicio de la transcripción de NIN (ATG), se muestra una región promotora en la que se diseñaron los oligos. FO, oligo delantero; RO, oligo inverso; ATG, codon de inicio; TAA, detener el codón.

Nombre	Concentración	Dilución	Secuencia
(oligo + agua)			
<b>prNIN For</b>	121 pmol/μL	9+91	CAC CAT AGC TCC CCA AAA TGG TAT
<b>prNIN Rev</b>	146 pmol/μL	7+93	CAT CTT CCT TCC ACT AAC TAA C

**Tabla 2 Oligos para la amplificación del promotor de NIN.**

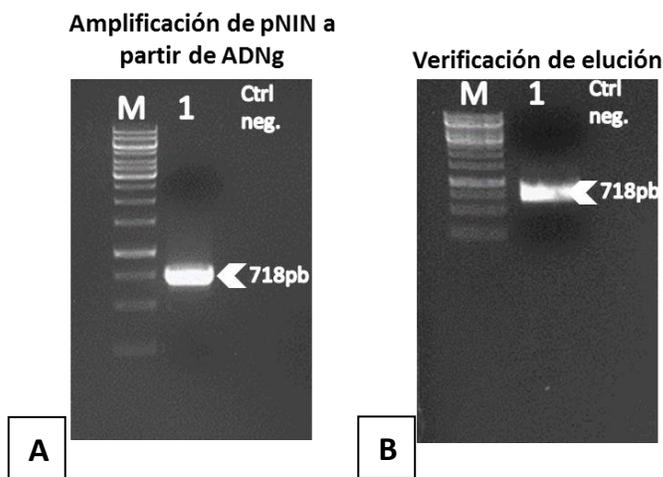
La secuencia CACC (en amarillo) contenida al principio de la secuencia del oligo forward es necesaria para la inserción direccional del fragmento a amplificar en el vector pENTR™/D-TOPO™.

## 7.2 Aislamiento y clonación del promotor de NIN en fusión con GUS mediante el sistema Gateway.

### Amplificación del promotor de NIN

El promotor de NIN se amplificó usando los oligos específicos del promotor y empleando ADN polimerasa Taq (aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*) de alta fidelidad. Con la mezcla de reacción (Tabla A1), se realizó la reacción de PCR usando el programa que consistió en las condiciones descritas en la Fig. A1.

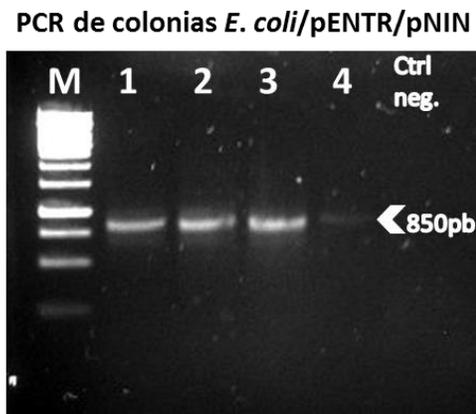
El producto amplificado se separó en gel de agarosa 1.2% a 100 V por 25 min. Se visualizó el fragmento de promotor esperado a 718 pb bajo un transiluminador de UV (Fig. 2A). El fragmento se aisló del gel y se purificó usando el kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction siguiendo las instrucciones del fabricante. El tamaño correcto del fragmento purificado se confirmó una vez más en un gel de agarosa (Fig. 2B).



**Fig. 2 Amplificación por PCR del promotor del gen NIN. A)** Amplificación a partir de ADN genómico de *P. vulgaris*. **B)** Fragmento purificado de banda de agarosa. El tamaño que amplifican los oligos diseñados es de 718 pb, que efectivamente es el tamaño obtenido en la banda de producto de PCR (flecha). **M:** Marcador de peso molecular 1 kb. **1:** En A: producto de PCR para amplificación de pNIN, en B: purificación del fragmento pNIN. **Ctrl neg.:** Control negativo, mezcla de todos los componentes de la reacción, excepto el ADN o templado.

### Transformación de *E. coli* con el vector de entrada pENTR/D-TOPO/pNIN

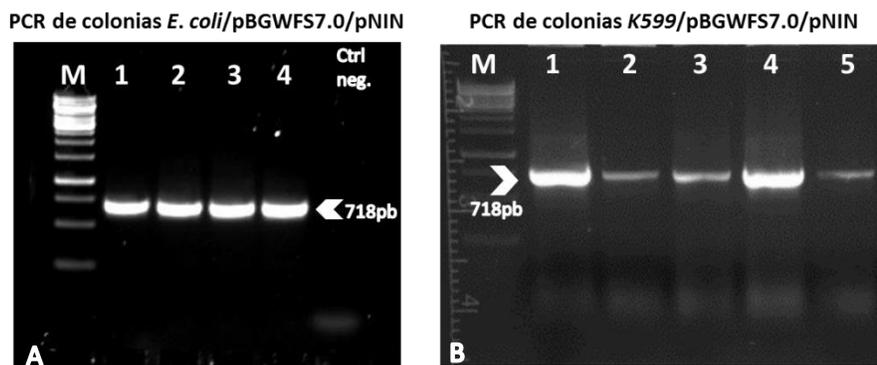
Las colonias obtenidas al día siguiente se sometieron a una PCR de colonia usando oligos específicos del promotor utilizado la mezcla de reacción de la Tabla 1 y bajo las condiciones de la Fig. A1, únicamente se extendió el tiempo de la primera etapa a 10 min puesto que se trataban de células y no ADN aislado. De entre las colonias positivas obtenidas, una se empleó para aislar el promotor y finalmente confirmar la clonación usando la combinación de oligos M13 forward y pNIN reverse. En este caso también hubo una variante en el programa (Fig. A1) pues la temperatura de fusión (melting temperature o  $T_m$ ) para los oligos M13 es menor ( $55^\circ\text{C}$ ). Un fragmento de 850 pb confirmó que la clona era positiva (Fig. 3).



**Fig. 3 PCR de colonia de las bacterias transformadas con pENTR/D-TOPO/pNIN.** El PCR muestra que la transformación fue exitosa (bandas de 850 pb señaladas con flecha). Se utilizó el oligo M13 forward del kit pENTR/D-TOPO y el oligo reverse específico para pNIN. **M:** Marcador de peso molecular 1 kb. **1-4:** Producto de PCR de distintas colonias amplificando M13-pNIN. **Ctrl neg.:** Control negativo, es decir, producto de PCR sin templado (colonia).

### Transformación de *E. coli* y *A. rhizogenes* con el vector final pBGWFS7.0/pNIN-EV

Luego de la ligación (Fig. A2), la mezcla de reacción se transformó dentro de células competentes de *E. coli* (TOP10). Las colonias positivas fueron seleccionadas usando oligos específicos del promotor. El plásmido pBGWFS7.0/pNIN aislado de células de *E. coli* positivas, se transformó en la cepa K599 de *A. rhizogenes*. De las cuales, se procedió a realizar nuevamente PCR de colonia, esta vez con los oligos específicos del promotor de NIN, obteniéndose nuevamente el tamaño esperado de 718 pb (Fig. 4).



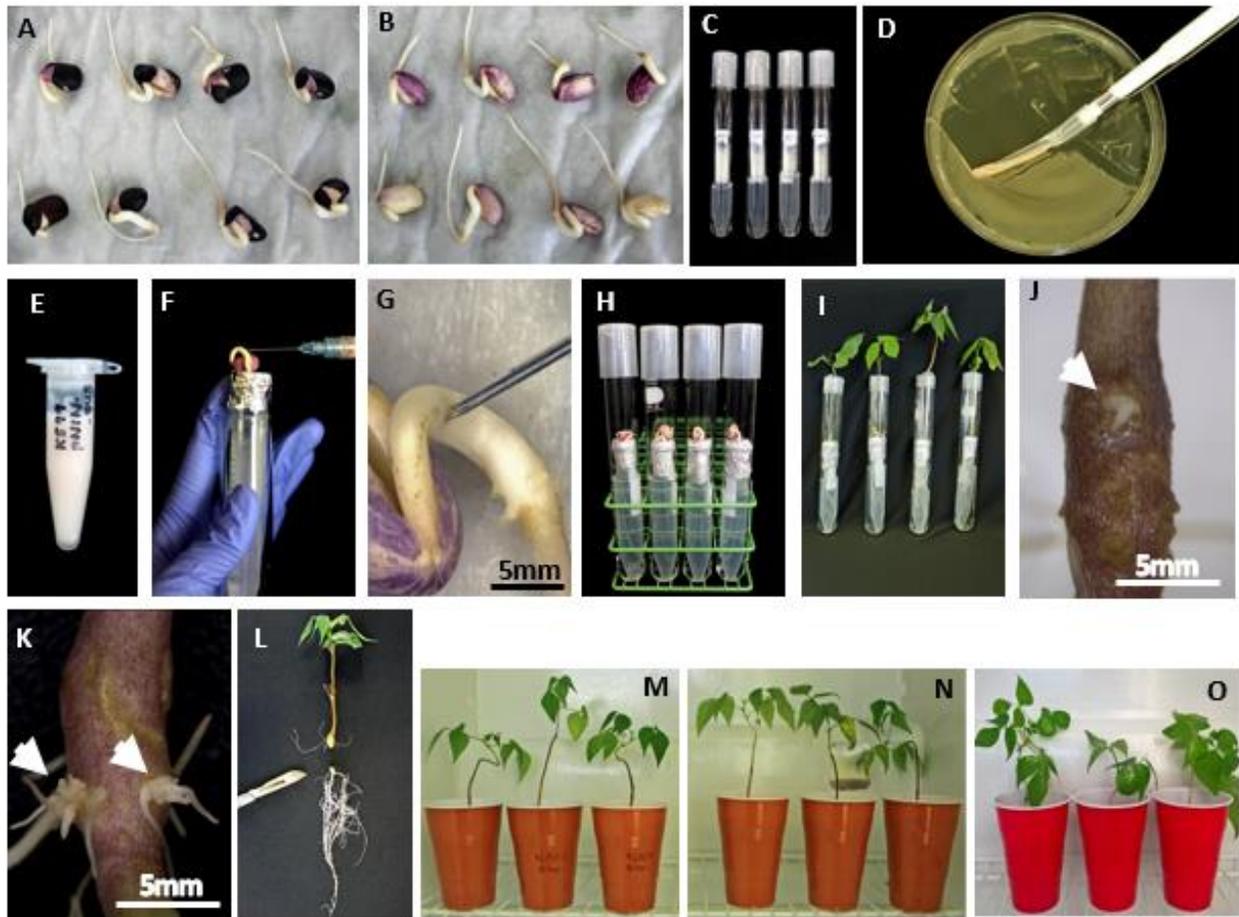
**Fig. 4 PCR de colonia de la transformación de *E. coli* y *A. rhizogenes* (K599) con el vector pBGWFS7.0/prNIN.** Todas las colonias fueron transformadas positivamente (bandas de 718 pb señaladas con flecha). **M:** Marcador de peso molecular 1 kb. **1-4:** Producto de PCR de distintas colonias amplificando M13-pNIN. **Ctrl neg.:** Control negativo, es decir, producto de PCR sin templado (colonia).

### **7.3 Análisis de los patrones de expresión espacio-temporal del promotor de NIN durante la simbiosis de *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus irregularis* en *Phaseolus vulgaris***

#### **Material biológico y sistema de inducción de hairy roots**

Dos días después de poner a germinar las semillas, se obtuvo un 90% de las semillas aptas para ser infectadas, es decir, 27 de 30 tenían un crecimiento de la raíz mayor a un centímetro, el otro 10% no germinó o la raíz era bastante pequeña para infectar (Fig. 5A-B). El crecimiento de bacterias en el medio selectivo fue satisfactorio, obteniéndose altas cantidades de bacteria distribuida a lo largo de toda la superficie de las cajas Petri (Fig. 5D).

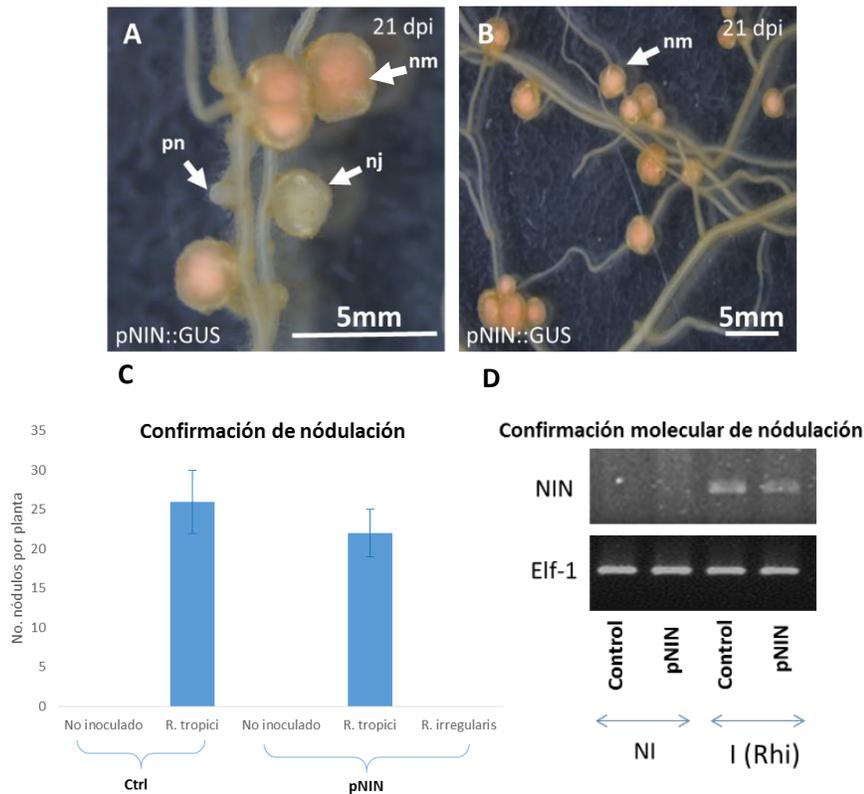
## Inducción de hairy roots mediante la inyección de *A. rhizogenes*



**Fig. 5** Inducción de hairy roots mediante la transferencia de material genético de *A. rhizogenes* a *P. vulgaris*. **A:** Semillas dos días de germinación. **B:** Semillas dos días de germinación sin testa. **C:** Sistema de inducción de hairy roots. **D:** Remoción del crecimiento de *A. rhizogenes* en medio PY. **E:** *A. rhizogenes* diluida en agua para inyectar en *P. vulgaris*. **F-G:** Inyección de la bacteria *A. rhizogenes* en hipocótilo. **H:** Sistema de inducción de hairy roots completo, dispositivo y semillas inyectadas. **I:** Plantas 10 días post inyección, sus hojas emergieron y se retiró tapa. **J:** Surgimiento de callos en heridas por inyección, plantas 8 días post inyección. **K:** Emersión de hairy roots desde callos, plantas 14 días post inyección. **L:** Remoción de raíces convencionales. **M-O:** Transferencia de plantas compuestas a sustrato. **M:** Plantas inoculadas con *R. tropici*. **N:** Plantas control (no inoculadas). **O:** Plantas inoculadas con *R. irregularis*.

Después de 8 días de la infección, algunas plantas ya presentaban callos en el sitio de inyección, sugiriendo el inicio de la inducción de hairy roots (Fig. 5J). Luego de 14 días después de la infección el sistema ya contaba con hairy roots (Fig. 5K y L) y se pudo proseguir a trasplantarlas a sustrato e inocularlas (Fig. 5M-O).

## Evaluación de colonización de *Rhizobium tropici* en raíces de *Phaseolus vulgaris*



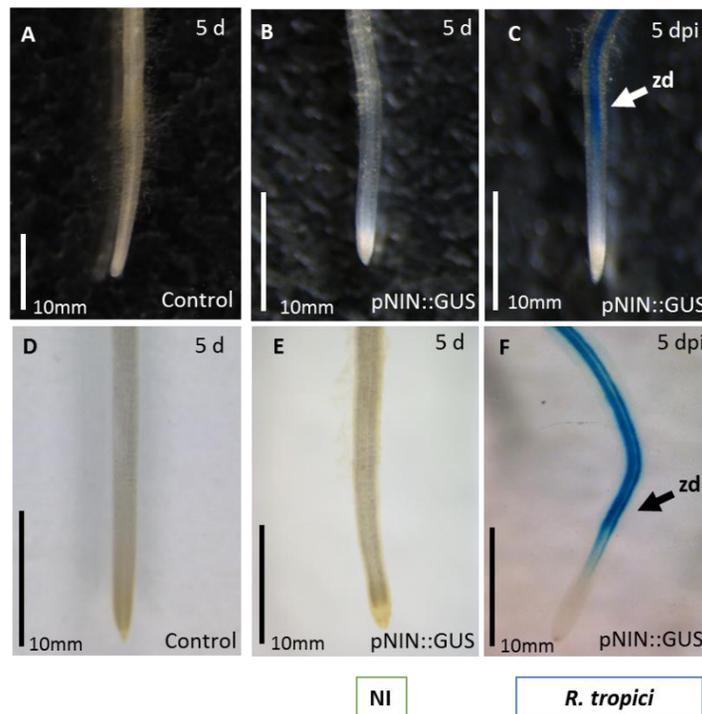
**Fig. 6 Verificación visual y molecular de la colonización del simbiote *Rhizobium tropici* en *P. vulgaris*.** **A y B:** verificación visual de colonización, nódulos a distintas etapas de desarrollo, desde primordios de nódulo hasta nódulos maduros los cuales muestran coloración rosada indicando que son funcionales y poseen la bacteria fijando nitrógeno dentro de ellos. **C:** Confirmación cuantitativa de nodulación mostrando el promedio de nódulos por planta. **D:** PCR de transcritos del gen específico de nodulación NIN para confirmación molecular. **pn:** primordio de nódulo. **nj:** nódulo joven. **nm:** nódulo maduro. **dpi:** días post inoculación. **NI:** no inoculado. **I:** inoculado.

La verificación de colonización de simbioses en el caso de nodulación es evidente debido a los órganos que genera (Fig. 6A y B). Sin embargo, para estar completamente seguros de que los nódulos observados se debían a la inoculación propia del experimento y no a contaminación, se realizó un conteo minucioso de nódulos en plantas inoculadas y no inoculadas de las distintas construcciones (Ctrl y pNIN). El resultado indicó que efectivamente sólo las plantas inoculadas con *R. tropici* generaban nódulos, a diferencia de las no inoculadas e inoculadas con *R. irregularis*, en las cuales hubo una ausencia total de nódulos (Fig. 6C).

Además, se llevó a cabo una confirmación molecular de la nodulación mediante la amplificación de transcritos del gen NIN (expresado específicamente durante nodulación) presentes en las raíces de las diversas muestras, mostrando efectivamente, expresión del gen NIN únicamente en plantas inoculadas (Fig. 6D).

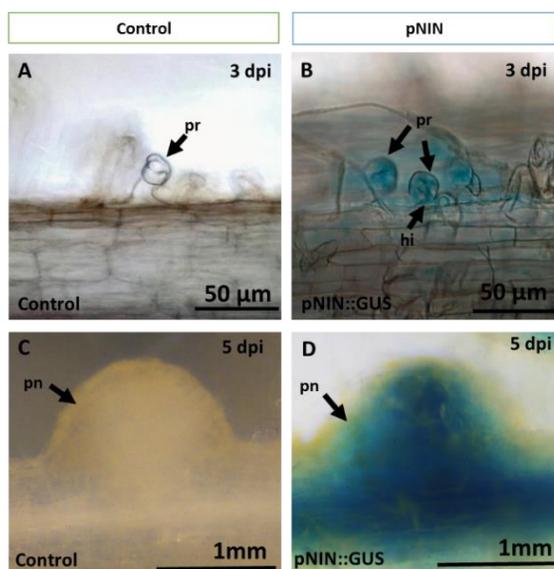
### Análisis de los patrones de expresión del promotor de NIN durante etapas tempranas de nodulación

Los patrones de expresión de pNIN durante nodulación se evaluaron a distintas etapas para mediante la coloración azul que proporciona el gen reportero GUS. A los 5 días post inoculación (dpi) se visualizaron patrones de expresión del promotor en raíces (Fig. 7). Se puede observar que *R. tropici* induce la actividad de pNIN en la zona de diferenciación de la raíz (Fig. 7C y F).



**Fig. 7 Patrones de expresión espacial de pNIN en etapas tempranas de nodulación.** Patrón espacial y temporal de expresión NIN revelado por el promotor NIN: GUS-GFP construcción en raíces peludas transgénicas incubadas con GUS como sustrato. **A y D:** raíces control sin inocular. **B y E:** raíces pNIN sin inocular, en ellas pNIN no se activa puesto que es simbiosis específico. **C y F:** raíces inoculadas con *R. tropici*, en ellas la actividad de pNIN se restringe a la zona de diferenciación. **d:** días. **dpi:** días post inoculación. **zd:** zona de diferenciación de la raíz. **NI:** no inoculado.

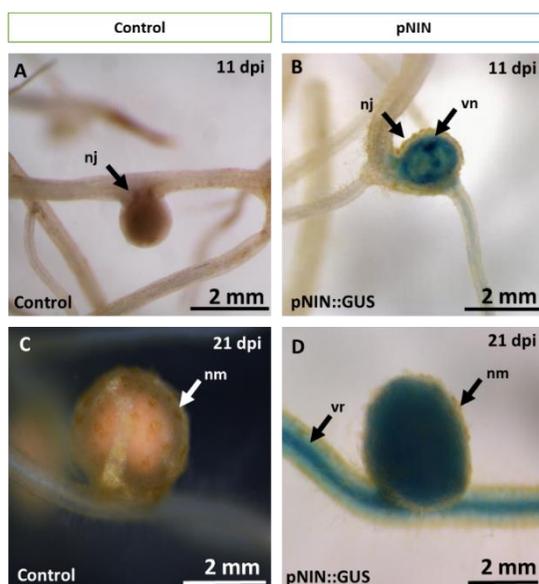
También en etapas tempranas (3-5 dpi) se visualizó la presencia de actividad de pNIN específicamente en estructuras de desarrollo de nódulo, como lo son hilos de infección y células corticales para formar primordios de nódulo (Fig. 8), mostrándose influencia de pNIN en los inicios de la nodulación.



**Fig. 8 Patrones de expresión espacial de pNIN en etapas tempranas de nodulación.** Plantas 3 dpi (**A y B**) y 5 dpi (**C y D**) con *R. tropici*. Plantas control (**A y C**) y plantas pNIN::GUS (**B y D**). **B**: Actividad de pNIN en pelos radicales iniciándose hilo de infección. **D**: Actividad de pNIN en primordio de nódulo y vasculatura vegetal. **pr**: pelo radical. **hi**: hilo de infección. **pn**: primordio de nódulo. **dpi**: días post inoculación.

## Análisis de los patrones de expresión del promotor de NIN durante etapas tardías de nodulación

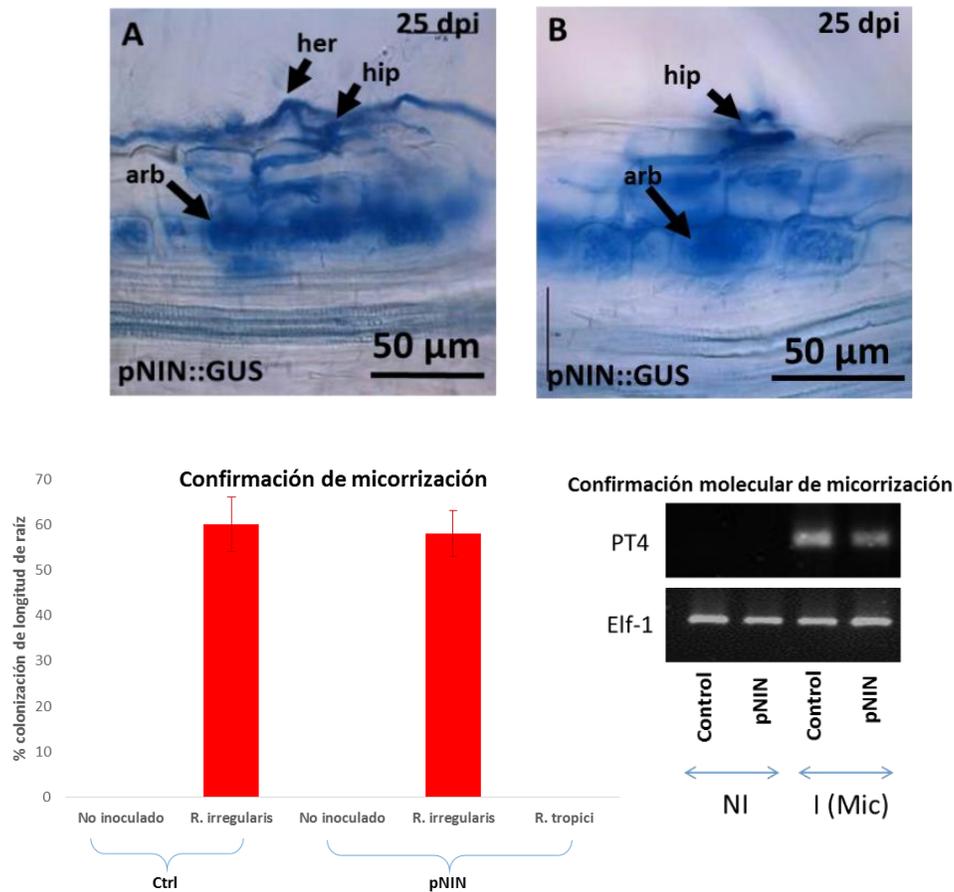
La actividad de pNIN se continuó monitoreando durante el desarrollo del nódulo en etapas tardías, es decir en nódulos jóvenes (11 dpi) y nódulos maduros (21 dpi). En esta etapa se muestra una distinción en la expresión de pNIN entre nódulos jóvenes y nódulos maduros, siendo delimitada a vasculatura del nódulo en los primeros y más generalizada para nódulos maduros (Fig. 9).



**Fig. 9 Patrones de expresión espacial de pNIN en etapas tardías de nodulación.** Plantas 11 dpi (**A y B**) y 21 dpi (**C y D**) con *R. tropici*. Plantas control (**A y C**) y plantas pNIN::GUS (**B y D**). **B**: Actividad de pNIN en vasculatura y zonas específicas de nódulo joven. **D**: Actividad de pNIN distribuida por todo el nódulo maduro y vasculatura vegetal. **nj**: nódulo joven. **vn**: vasculatura de nódulo. **nm**: nódulo maduro. **vr**: vasculatura radical. **dpi**: días post inoculación.

## Evaluación de colonización de *Rhizophagus irregularis* en raíces de *Phaseolus vulgaris*

A diferencia de la evaluación de nodulación, para micorrización, observar la colonización a simple vista es imposible. Por ello, se realizó una tinción histológica de exclusión con el reactivo Trypan blue con un procedimiento mejorado de aclarado de raíces y detección de parásitos y micorrizas, lográndose obtener imágenes de todas las etapas de micorrización, desde hifa extraradical y arbusculos. (Fig. 10A y B).



**Fig. 10 Verificación visual y molecular de la colonización del simbiote *Rhizophagus irregularis* en *P. vulgaris*.** **A y B:** verificación visual de colonización mediante la tinción con TRYPAN BLUE, se muestran distintas etapas de desarrollo de la hifa. **her:** hifa extraradical. **hip:** hipopodio, estructura de penetración del hongo. **arb:** arbusculo, etapa final de colonización y en donde ocurre el intercambio de nutrientes. **C:** Confirmación cuantitativa de micorrización representado por el porcentaje de colonización de longitud de raíz. **D:** PCR de transcritos del gen específico de micorrización PT4 para confirmación molecular. **NI:** no inoculado. **I:** inoculado.

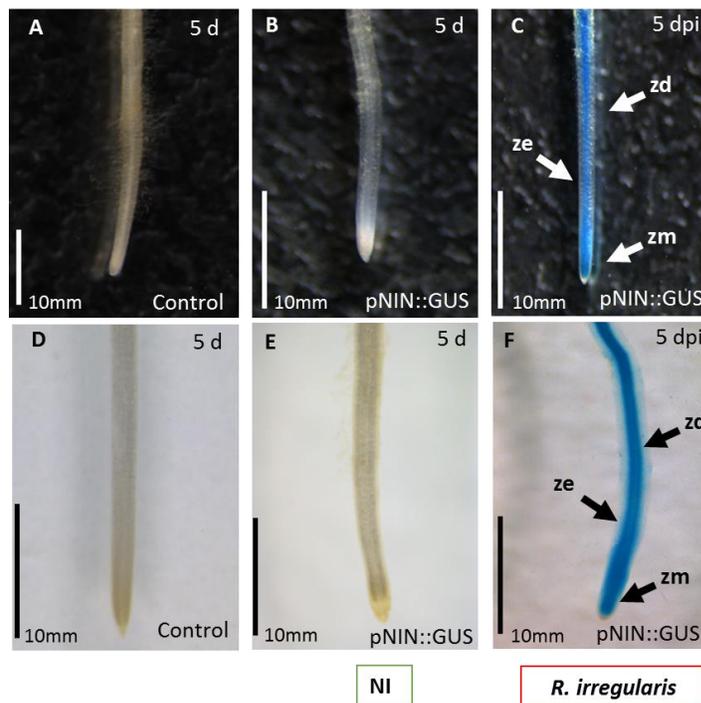
Además, al igual que en la evaluación de la nodulación, para evaluar la colonización de micorriza de manera cuantitativa y para estar seguros de que no existió alguna contaminación, se midió el porcentaje de la longitud de raíz colonizada en plantas inoculadas y no inoculadas de las distintas construcciones (Ctrl y pNIN).

El resultado indicó que efectivamente sólo las plantas inoculadas con *R. irregularis* poseían cierto porcentaje de colonización, a diferencia de las no inoculadas e inoculadas con *R. tropici*, en las cuales hubo una ausencia total de colonización (Fig. 10C).

Posteriormente, se realizó la confirmación molecular de la micorrización mediante la amplificación de transcritos del gen PT4 (expresado específicamente durante micorrización) presentes en las raíces de las diversas muestras, mostrando efectivamente, expresión del gen PT4 únicamente en plantas inoculadas sin importar la construcción (Fig. 10D).

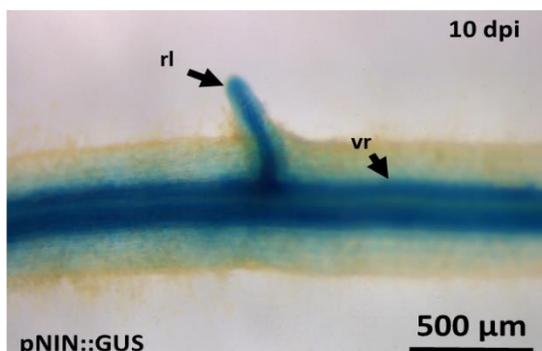
## Análisis de los patrones de expresión del promotor de NIN durante micorrización

Al evaluar los patrones de expresión de pNIN en raíces jóvenes, a diferencia de las muestras inoculadas con rhizobia (Fig. 7C y F), las inoculadas con micorriza inducen su actividad en toda la raíz, zona meristemática, de elongación y de diferenciación (Fig. 11C y F).



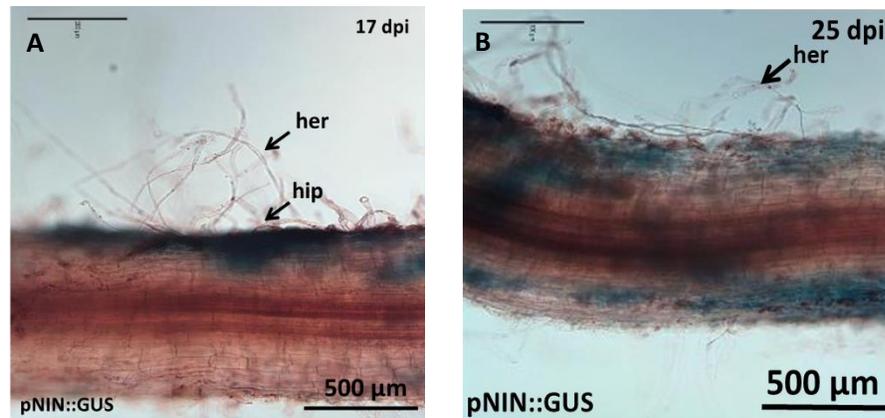
**Fig. 11 Patrones de expresión espacial de pNIN en etapas tempranas de micorrización obtenidos mediante la tinción histoquímica con GUS:X-gluc. A y D:** raíces control sin inocular. **B y E:** raíces pNIN sin inocular, en ellas pNIN no se activa puesto que es simbiosis específico. **C y F:** raíces inoculadas con *R. tropici*, en ellas la actividad de pNIN se expande por toda la raíz. **d:** días. **dpi:** días post inoculación. **zm:** zona meristemática. **ze:** zona de elongación. **zd:** zona de diferenciación. **NI:** no inoculado.

Por otro lado, en etapas posteriores de la colonización de micorriza, pNIN se expresa también en raíces laterales emergentes de manera intensa y uniforme (Fig. 12).



**Fig. 12 Patrones de expresión de pNIN durante la colonización de micorriza, en raíces laterales.** La expresión de pNIN se muestra ampliamente distribuida tanto en vasculatura radicular como en raíces laterales emergentes. **rl:** raíz lateral. **vr:** vasculatura radical. **dpi:** días post inoculación.

Por último se realizó contrateñido para poder visualizar en una misma imagen la expresión de pNIN, mediante la tinción histoquímica con el buffer GUS:X-gluc, y la localización de la colonización mediante tinción con safranina al 1%. Con ello se obtuvo que en etapas medias y tardías (Fig. 13A y B, respectivamente) existe una colocalización entre la expresión de pNIN (expresión en parches) y los sitios de ingreso del simbionte a la raíz (hip).



**Fig. 13** Contrateñido, en azul la expresión de GUS que muestra la localización de actividad de NIN, en rojo teñido con safranina que se une a pared celular de la planta y el hongo. **A:** 17 dpi expresión de NIN en células de la epidermis y córtex exterior. Se puede observar una co-localización de la actividad de pNIN (GUS) y el ingreso del hongo en la raíz (hip). **B:** 25 dpi expresión de NIN en células de la epidermis, córtex exterior, córtex interior e incluso en zona de vasculatura radical. Se conserva la expresión en parches. **her:** hifa extraradical. **hip:** hipopodio. **dpi:** días post inoculación.

## 8. Discusión

En el presente trabajo, hemos identificado el promotor del gen NIN en *P. vulgaris* y estudiado los patrones de expresión espaciotemporales del promotor de este factor de transcripción NIN durante las interacciones simbióticas de nodulación y micorrización con *P. vulgaris*. Encontramos que en *P. vulgaris*, el factor de transcripción NIN se expresa específicamente durante la infección microbiana (rhizobia) y la organogénesis del nódulo como se ha reportado con anterioridad en *L. japonicus* y *M. truncatula*. Adicionalmente, nuestros estudios también muestran expresión del promotor de NIN en respuesta a la inoculación con hongo micorrízico arbuscular, respuesta que es raramente documentada durante la interacción de *R. irregularis* con plantas huéspedes.

## 8.1 Análisis del promotor de NIN

Para entender la regulación transcripcional y la potencial función del gen PvNIN, analizamos los elementos cis-regulatorios en la secuencia del promotor usando el software PlantTFDB. Los resultados mostraron 30 sitios de unión a factores de transcripción distribuidos en 9 familias de proteínas para la región de 718 pb del promotor de NIN. Los factores de transcripción pertenecían a las familias de proteínas AP2/ERF, B3, BBR-BPC, bHLH, C2H2, G2-like, GATA, MICK\_MADS y TCP.

Las proteínas AP2/ERF poseen funciones importantes en la regulación transcripcional de una variedad de procesos biológicos relacionados a crecimiento y desarrollo, así como a diversas respuestas a estímulos ambientales. Se ha reportado también que los factores de transcripción AP2/ERF son altamente relevantes en la simbiosis rizobial (Andriankaja et al., 2007; Nova-Franco et al., 2015; Yano et al., 2008) y micorrízica (Jiang et al., 2017; Xue et al., 2015). La familia B3 incluye a la familia Auxin Response Factor (ARF), la cual juega un papel esencial durante la nodulación, tomando en cuenta la importancia de la señalización de auxinas durante simbiosis (Chapman et al., 2012; Kondorosi et al., 2005; Nallu et al., 2013; Roudier et al., 2003; van Noorden et al., 2007). Las proteínas basic helix–loop–helix (bHLH) constituyen unas de las más grandes familias de factores de transcripción, se encuentran ampliamente distribuidas en eucariontes (Stevens et al., 2008), y están involucradas en una variedad de procesos de señalización y desarrollo en plantas (Carretero-Paulet et al., 2010; Heim et al., 2003; Li et al., 2006; Toledo-Ortiz et al., 2003). Distintos genes bHLH de leguminosas asociados con el desarrollo de raíz o nódulo han sido estudiados hasta ahora, entre ellos se encuentran: GmSAT, originalmente descrito como codificante de un transportador de amonio en soya (Godiard et al., 2011; Kaiser et al., 1998; Marini et al., 2000), y LjRHL1 implicado en el desarrollo de pelos radiculares de *L. japonicus* (Karas et al., 2009). Los factores de transcripción C2H2 son reconocidos por participar en procesos de crecimiento y desarrollo en cualquier eucarionte. Existen reportes que sugieren el papel de éstos en nodulación (Sinharoy et al., 2013). Distintos miembros de la familia de factores de transcripción MADS fueron identificados por ser esenciales para la simbiosis rizobial en *Medicago sativa* (Heard et al., 1995; 1997; Zuccherro et al., 2001) y *Glycine max* (Liu et al., 2015). Estudios recientes muestran también el rol putativo de los factores de transcripción TCP en la regulación de la nodulación en *M. truncatula* (H. Wang et al., 2018).

El análisis del promotor y la revisión en literatura de las familias de proteínas que se unen a PvNIN sugiere que una parte de estas uniones podría jugar un papel indispensable en la simbiosis rizobial y/o micorrízica.

## 8.2 Expresión del promotor de NIN es específica para estructuras simbióticas durante la simbiosis rizobial

*NIN* fue uno de los primeros genes en ser genéticamente caracterizados por su rol en la regulación de procesos de nodulación (Schauser et al., 1999) en *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*. Los patrones de expresión del gen reportero GUS conducidos por el promotor de NIN en *Phaseolus* mostraron una expresión distintiva localizada en células de epidermis de la zona de diferenciación de la raíz después de la inoculación con *Rhizobium*. Además, se encontró expresión del promotor en hilos de infección y en células corticales en división, lo cual fue asociado al desarrollo de primordios de nódulo. Observaciones similares fueron registradas en *L. japonicus* (Heckmann et al., 2011; Kosuta et al., 2011; Popp & Ott, 2011; Soyano et al., 2013; Vernié et al., 2015). Nuestros hallazgos están en conformidad con estudios anteriores donde se encontró que la transcripción de NIN está altamente inducida sólo después de la inoculación con *Rhizobium*, y la expresión constitutiva de NIN podría llevar a la división ectópica de células corticales en ausencia de *Rhizobium*. Estos experimentos también muestran la expresión inducida del gen de nodulación específico ENOD40. Estos resultados indican que NIN posee un papel central en la organogénesis del nódulo (Schauser et al., 1999; Soyano et al., 2013; Suzaki et al., 2012; Tirichine et al., 2007). Sin embargo, estudios en *M. truncatula* discuten también la regulación de retroalimentación negativa del número de nódulos por NIN mediante la regulación de la expresión de genes CLE (Mortier et al., 2010).

A diferencia de estudios previos, nosotros continuamos con nuestras observaciones de la expresión del promotor de NIN en nódulos jóvenes y maduros. En nódulos jóvenes, aunque se encontró expresión del promotor generalizada en el nódulo, se obtuvo una expresión más pronunciada en tejidos vasculares. Por otro lado, los nódulos maduros de 21 dpi mostraron que el promotor se expresa por igual en todos los tejidos del nódulo. Estas observaciones sugieren un posible rol indefinido del gen NIN durante la fijación de nitrógeno, lo que requiere una investigación adicional.

### 8.3 Promotor de NIN se expresa en respuesta a la inoculación de micorriza en *Phaseolus*

Se ha visto durante nodulación que entre los numerosos factores de transcripción conocidos involucrados en la CSSP, el fallo de al menos uno de ellos resulta en la incapacidad completa para que la planta forme nódulos. Interesantemente, mutantes de algunos de estos FT como IPD3, NSP1 o NSP2, mantienen su habilidad para formar simbiosis micorrízica, pero con una menor eficiencia (Delaux et al., 2013; Horváth et al., 2011; Maillet et al., 2011; Xue et al., 2015). Recientemente, se ha demostrado que dos factores de transcripción GRAS, NSP1 y NSP2 (Nodulation Signaling Pathway), son componentes de la ruta de señalización MYC (Delaux et al., 2013; Laressergues et al., 2012; Maillet et al., 2011). Estos reguladores transcripcionales actúan para coordinar la expresión de genes asociados a nodulación tales como Early Nodulin 11 (ENOD11), un gen marcador de respuestas inducidas por Nod Factors (Andriankaja et al., 2007). Algunos otros FT, tales como ERN1, ERN2, NF-YA1 y NF-YA2 parecen tener roles similares (Andriankaja et al., 2007; Laloum et al., 2014; Middleton et al., 2007).

En el presente trabajo, analizamos la expresión espacio-temporal de PvNIN en *P. vulgaris* inoculado con *R. irregularis*. Encontramos que las raíces inoculadas con micorriza presentaron expresión del promotor en toda la raíz a los 5 dpi y más tarde. En relación a esto, se determinó también con la mutante *nin* en *Medicago truncatula*, pues en ella se presentó una reducción en eventos de colonización y formación de arbusculos de *R. irregularis* (Guillotín et al., 2016). También, luego de 10 días post inoculación, la expresión de pNIN continuó distribuida por toda la raíz, incluidas raíces laterales emergentes (Fig. 13). Lo que podría implicar la participación de NIN en el desarrollo de raíces laterales inducido por la presencia de micorriza.

Por otro lado, los resultados durante etapas tardías de micorrización mostraron expresión en parches (Fig. 14) lo que probablemente tenga que ver con la formación del PPA. En esta formación se ha visto ampliamente involucrada CcAMK, sugiriendo que existe una programación de acomodación intracelular previa a la infección que podría ser común en la vía de simbiosis como lo es esta proteína (Takeda et al., 2012). Las células sometidas a esta rediferenciación no se distribuyen uniformemente a lo largo de la raíz, sino que de igual manera ocurre en parches de células corticales adyacentes a las primeras unidades de colonización (Gutjahr & Parniske, 2013). Indicando además, que este reacomodo intracelular sirve también como un patrón preformado para la colonización.

En conjunto, nuestros estudios sobre patrones de expresión espacio-temporal del promotor PvNIN durante simbiosis rizobial y micorrízica en *P. vulgaris* muestran que este factor de transcripción posee un papel crucial en la regulación de ambos tipos de asociaciones simbióticas. La caracterización funcional debería proporcionarnos una mayor comprensión sobre el modo exacto de regulación en el que actúa el factor de transcripción NIN para establecer las relaciones simbióticas de *P. vulgaris* con *Rhizobium tropici* y *R. irregularis*.

## 9. Conclusiones

Los resultados de análisis de los patrones de expresión muestran que el promotor de NIN se expresa en la zona de diferenciación de la raíz bajo inoculación de *Rhizobium tropici* y que existe una respuesta temprana en pelos radicales, primordios de nódulos y vasculatura radicular de *Phaseolus vulgaris*.

Por otro lado, en etapas tardías de la nodulación en *Phaseolus vulgaris*, los nódulos jóvenes exhiben que la expresión de NIN se encuentra en tejido vascular y más tarde en nódulos maduros la expresión se presenta en toda la estructura del nódulo.

En cuanto a la expresión de pNIN en *Phaseolus vulgaris* días posteriores a la inoculación (5 días) con *Rhizophagus irregularis*, se exhibe una expresión ubicua en raíces. Es decir, esta expresión se extiende por las distintas zonas de la raíz: zona de diferenciación, zona de elongación y zona meristemática.

Durante el inicio de micorrización, la expresión de NIN se localiza en el sitio de formación del hipopodio y a lo largo de hifas intra y extra radicales. En etapas tardías, la expresión de NIN está asociada a células que contienen arbusculos.

Basándonos en estos estudios, NIN podría ser un gen potencial perteneciente a la ruta de señalización simbiótica común, y por tanto, un gen importante en el desarrollo de la nodulación y la micorrización, lo cual requiere ser demostrado en análisis futuros en *Phaseolus vulgaris*.

## 10. Productos generados

### 10.1 Artículos publicados

1. Kalpana Nanjareddy, Manoj-Kumar Arthikala, **Alma-Leticia Aguirre**, Brenda-Mariana Gómez, Miguel Lara (2017). Plant promoter analysis: Identification and characterization of root nodule specific promoter in common bean. *Journal of Visualized Experiments* (130), e56140. doi:10.3791/56140

## 10.2 Congresos

1. Kalpana Nanjareddy, Lourdes Blanco, Manoj-Kumar Arthikala, Xóchitl Alvarado-Affantranger, **Alma Leticia Aguirre Alcalá** and Miguel Lara (2015). SnRK3.10, a Snf1-like serine/threonine kinase regulates root nodule development and nitrogen fixation in bean. XVI National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology & IX Symposium Mexico/USA, Queretaro, Mexico, 7 - 11 December, 2015. P82.
2. Fátima Arizbeth Plascencia de Ande, Jessica Montserrat Aguilar Venegas, Leslie Maria Eugenia Martinez Silva, Ana-Cecilia Méndez Sotelo, **Alma-Leticia Aguirre Alcalá**, Manoj-Kumar Arthikala, Lourdes Blanco, Miguel Lara and Kalpana Nanjareddy (2015). Auxin patterns in cytokinin triggered spontaneous pseudo-nodule organogenesis in *Phaseolus vulgaris*. XVI National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology & IX Symposium Mexico/USA, Queretaro, Mexico, 7 - 11 December, 2015. P49.
3. **Alma-Leticia Aguirre**, Kalpana Nanjareddy, Miguel Lara, Manoj-Kumar Arthikala (2016). Global expression profiling reveals genetic networks associated with growth and development in TOR downregulated *Phaseolus vulgaris* roots. XXXI Congreso Nacional de Bioquímica, Aguascalientes, Mexico, 6 - 11 November, 2016. SB-2; P 13.
4. Manoj-Kumar Arthikala, **Alma-Leticia Aguirre**, Kalpana Nanjareddy and Miguel Lara (2017). The NIN transcription factor coordinates arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Phaseolus vulgaris*. XII Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos, Queretaro, Mexico, 22-26 October, 2017. Poster 67, P 136.
5. Brenda Mariana Gómez Ramírez, **Alma Leticia Aguirre Alcalá**, Kalpana Nanjareddy, Lourdes Blanco, Miguel Lara, Manoj-Kumar Arthikala (2015). Comparative transcriptomics of common bean reveals a conserved genetic program between arbuscular mycorrhizal and rhizobial symbioses. XVI National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology & IX Symposium Mexico/USA, Queretaro, Mexico, 7 - 11 December 2015. P81.

## 11. Bibliografía

- Akiyama, K., Matsuzaki, K., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v435/n7043/abs/nature03608.html>
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D. G., & de Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor–dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *The Plant Cell*, 19(9), 2866–2885.

- B.D., W., C.L., T., & S.P., L. (1977). A morphological study of the development of reproductive structures of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal American Society for Horticultural Science*.
- Banba, M., Gutjahr, C., Miyao, A., Hirochika, H., Paszkowski, U., Kouchi, H., & Imaizumi-Anraku, H. (2008). Divergence of evolutionary ways among common sym genes: CASTOR and CCaMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant & Cell Physiology*, 49(11), 1659–1671. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn153>
- Banba, M., Gutjahr, C., Miyao, A., Hirochika, H., Paszkowski, U., Kouchi, H., & Imaizumi-Anraku, H. (2008). Divergence of Evolutionary Ways Among Common sym Genes: CASTOR and CCaMK Show Functional Conservation Between Two Symbiosis Systems and Constitute the Root of a Common Signaling Pathway. *Plant and Cell Physiology*, 49(11), 1659–1671. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn153>
- Bandoni, R. J. (1979). Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia*, 71, 873–874.
- Barraza, A., Coss-Navarrete, E. L., ... Alvarez-Venegas, R. (2018). Down-regulation of PvTRX1h increases nodule number and affects auxin, starch, and metabolic fingerprints in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 274, 45–58.
- Bhuvaneswari, T. V., & Solheim, B. (1985). Root hair deformation in the white clover/*Rhizobium trifolii* symbiosis. *Physiologia Plantarum*, 63(1), 25–34.
- Broughton, W. J., & Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal*, 125(4), 1075–1080.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55–128. <https://doi.org/10.1023/A:1024146710611>
- Brown, L., & Kane, H. (1995). Full house: Reassessing the earth's population carrying capacity. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=qjMgn\\_50UxAC&oi=fnd&pg=PA21&dq=Full+House:+Reassessing+the+Earth%27s+Population+Carrying+Capacity+&ots=KAeHv70q85&sig=ft26D5RYc3\\_bl6e4kS\\_aCrrppds](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=qjMgn_50UxAC&oi=fnd&pg=PA21&dq=Full+House:+Reassessing+the+Earth%27s+Population+Carrying+Capacity+&ots=KAeHv70q85&sig=ft26D5RYc3_bl6e4kS_aCrrppds)
- Callaham, D. A., & Torrey, J. G. (1981). The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1647–1664.
- Calvert, H. E., Pence, M. K., Pierce, M., Malik, N. S. A., & Bauer, W. D. (1984). Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Canadian Journal of Botany*, 62(11), 2375–2384.

- Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J. F., Bilbao-Castro, J. R., & Robertson, D. L. (2010). Genome wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss and algae. *Plant Physiology*, pp-110.
- Catoira, R., Galera, C., ... Dénarié, J. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *The Plant Cell*, 12(9), 1647–1665.
- Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s10529-011-0785-3>
- Chapman, E. J., Greenham, K., Castillejo, C., Sartor, R., Bialy, A., Sun, T., & Estelle, M. (2012). Hypocotyl transcriptome reveals auxin regulation of growth-promoting genes through GA-dependent and independent pathways. *PLoS One*, 7(5), e36210.
- Chilton, M., Tepfer, D., Petit, A., & David, C. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*. Retrieved from <https://www.nature.com/nature/journal/v295/n5848/abs/295432a0.html>
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 687–700.
- Christou, P. (1997). Biotechnology applied to grain legumes. *Field Crops Research*, 53(1–3), 83–97. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00024-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00024-5)
- Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Kevin Lutke, W., & Taylor, C. G. (2005). Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *The Plant Journal*, 43(3), 449–457.
- Combard, A., Brevet, J., Borowski, D., Cam, K., & Tempé, J. (1987). Physical map of the T-DNA region of *Agrobacterium rhizogenes* strain NCPPB2659. *Plasmid*, 18(1), 70–75. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(87\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0147-619X(87)90079-5)
- de Almeida, G. E., da Silva, K., Pissini, S. M., & de Oliveira, A. C. (2006). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94(3), 327–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.020>
- De la Rosa, C., Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. (2018). A dicistronic precursor encoding miR398 and the legume-specific miR2119 co-regulates CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit. *Plant, Cell & Environment*.
- Delaux, P., Bécard, G., & Combier, J. (2013). NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytologist*, 199(1), 59–65.

- Delgado-Sánchez, P., & Saucedo-Ruiz, M. (2006). An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016894520500422X>
- Demchenko, K., Winzer, T., Stougaard, J., Parniske, M., & Pawlowski, K. (2004). Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytologist*, *163*(2), 381–392.
- Ehrlich, P., & Ehrlich, A. (1990). The population explosion. Retrieved from [http://www.academia.edu/download/30552625/wc-a\\_overpopulation\\_articles\\_fall\\_2010.doc](http://www.academia.edu/download/30552625/wc-a_overpopulation_articles_fall_2010.doc)
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., ... Sánchez, F. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* Transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics, *19*(12), 1385–1393. <https://doi.org/10.1094>
- FAO. (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture: managing systems at risk. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123051697>
- FAO, & ITP. (2015). *Status of the World's Soil Resources: Technical Summary. Food and Agriculture Organization of the United*. [https://doi.org/ISBN 978-92-5-109004-6](https://doi.org/ISBN%20978-92-5-109004-6)
- Feddermann, N., Duvvuru Muni, R. R., Zeier, T., Stuurman, J., Ercolin, F., Schorderet, M., & Reinhardt, D. (2010). The PAM1 gene of petunia, required for intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi, encodes a homologue of VAPYRIN. *The Plant Journal*, *64*(3), 470–481.
- Feddermann, N., & Reinhardt, D. (2011). Conserved residues in the ankyrin domain of VAPYRIN indicate potential protein-protein interaction surfaces. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(5), 680–684.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., ... Gresshoff, P. M. (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation, *52*(1), 61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>
- Fisher, R., & Long, S. (1992). Rhizobium–plant signal exchange. *Nature*. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v357/n6380/abs/357655a0.html>
- Francia, D., Chiltz, A., Lo Schiavo, F., Pugin, A., Bonfante, P., & Cardinale, F. (2011). AM fungal exudates activate MAP kinases in plant cells in dependence from cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase. *Plant Physiology and Biochemistry*, *49*(9), 963–969. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.04.008>
- Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (6).
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of

- temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280–300.
- Gelvin, S. (2009). Agrobacterium in the genomics age. *Plant Physiology*. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/150/4/1665.short>
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., & Barker, D. G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*, 17(12), 3489–3499.
- Genre, A., & Russo, G. (2016). Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant-Microbe Interactions? *Frontiers in Plant Science*, 7, 96. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00096>
- Gepts, P., & Debouck, D. (Department of A. and R. S. U. of C. D. C. (USA)). (1991). Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). CAB International. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9117244>
- Gianinazzi, S., & Schüepp, H. (1994). Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=WNSEFuqWieoC&oi=fnd&pg=PP7&dq=+Impact+of+arbuscular+mycorrhizas+on+sustainable+agriculture+and+natural+ecosystems&ots=wn\\_IQg6gow&sig=IHPD0RRMrX5JTzy9SraiqrXKVw](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=WNSEFuqWieoC&oi=fnd&pg=PP7&dq=+Impact+of+arbuscular+mycorrhizas+on+sustainable+agriculture+and+natural+ecosystems&ots=wn_IQg6gow&sig=IHPD0RRMrX5JTzy9SraiqrXKVw)
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B. W., & Oldroyd, G. E. D. (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature*, 441(7097), 1149.
- Glyan'ko, A. K. (2015). Signaling Systems of Rhizobia (Rhizobiaceae) and Leguminous Plants (Fabaceae) upon the Formation of a Legume-Rhizobium Symbiosis (Review). *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, 51(5), 453–464. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596081>
- Godfray, H., Beddington, J., Crute, I., & Haddad, L. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/327/5967/812.short>
- Godiard, L., Lepage, A., Moreau, S., Laporte, D., Verdenaud, M., Timmers, T., & Gamas, P. (2011). MtbHLH1, a bHLH transcription factor involved in *Medicago truncatula* nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges. *New Phytologist*, 191(2), 391–404.
- Goethals, K., & Montagu, M. Van. (1992). Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proceedings of The*. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/89/5/1646.short>
- Goltapeh, E. M., Danesh, Y. R., Prasad, R., & Varma, A. (2008). Mycorrhizal Fungi: What We Know and What

- Should We Know? In *Mycorrhiza* (pp. 3–27). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_1)
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., & Frugier, F. (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, *18*(10), 2680–2693. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043778>
- Groth, M., Takeda, N., ... Wang, T. L. (2010). NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *The Plant Cell*, tpc-109.
- Guillotin, B., Couzigou, J.-M., & Combier, J.-P. (2016). NIN is involved in the regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1704.
- Gutjahr, C., & Parniske, M. (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *29*, 593–617.
- Gutjahr, C., Radovanovic, D., ... Guiderdoni, E. (2012). The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. *The Plant Journal*, *69*(5), 906–920.
- Harrison, M., Dewbre, G., & Liu, J. (2002). A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/14/10/2413.short>
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A., & Bashir, S. (2014). Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(5), 580–592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.596639>
- Heard, J., Caspi, M., & Dunn, K. (1997). Evolutionary diversity of symbiotically induced nodule MADS box genes: characterization of nmhC5, a member of a novel subfamily. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *10*(5), 665–676.
- Heard, J., & Dunn, K. (1995). Symbiotic induction of a MADS-box gene during development of alfalfa root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(12), 5273–5277.
- Heckmann, A. B., Sandal, N., ... Stougaard, J. (2011). Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(11), 1385–1395.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P. C. (2003). The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, *20*(5), 735–747.

- Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A. B., Downie, J. A., & Oldroyd, G. E. D. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, *21*(2), 545–557.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Kononowicz, A. K. (2014). *Phaseolus vulgaris* — Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances*, *32*(7), 1205–1215. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.06.001>
- Horváth, B., Yeun, L. H., ... Tadege, M. (2011). *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(11), 1345–1358.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., & Perry, J. (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v433/n7025/abs/nature03237.html>
- Isayenkov, S., Mrosk, C., Stenzel, I., Strack, D., & Hause, B. (2005). Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiology*, *139*(3), 1401–1410.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(21), 8316–8321.
- Jakobsen, I. (1999). Transport of Phosphorus and Carbon in Arbuscular Mycorrhizas. In *Mycorrhiza* (pp. 305–332). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03779-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03779-9_13)
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(5), 1720–1725.
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, *5*(4), 387–405.
- Jiang, Y., Wang, W., ... Tang, D. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*, eaam9970.
- Johansson, J. F., Paul, L. R., ... B.J.J., L. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, *48*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.11.012>
- Kaiser, B. N., Finnegan, P. M., Tyerman, S. D., Whitehead, L. F., Bergersen, F. J., Day, D. A., & Udvardi, M. K.

- (1998). Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science*, 281(5380), 1202–1206.
- Kammen, A. Van. (1984). Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*. Retrieved from <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF03015869.pdf>
- Kanamori, N., Madsen, L., & Radutoiu, S. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of The*. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/103/2/359.short>
- Kaplan, L., & Lynch, T. F. (1999). Phaseolus (Fabaceae) in Archaeology: AMS. *Economic Botany*, 53(3), 261–272. <https://doi.org/10.1007/BF02866636>
- Karas, B., Amyot, L., Johansen, C., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., & Szczyglowski, K. (2009). Conservation of lotus and Arabidopsis basic helix-loop-helix proteins reveals new players in root hair development. *Plant Physiology*, 151(3), 1175–1185.
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195.
- Kevei, Z., Loughon, G., ... Kiss, G. B. (2007). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in Medicago truncatula. *The Plant Cell*, 19(12), 3974–3989.
- Kistner, C., Winzer, T., ... Webb, K. J. (2005). Seven Lotus japonicus genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *The Plant Cell*, 17(8), 2217–2229.
- Kondorosi, E., Redondo-Nieto, M., & Kondorosi, A. (2005). Ubiquitin-mediated proteolysis. To be in the right place at the right moment during nodule development. *Plant Physiology*, 137(4), 1197–1204.
- Koninck, P. De, & Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science*. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/279/5348/227.short>
- Kosuta, S., Held, M., ... Downie, A. J. (2011). Lotus japonicus symRK-14 uncouples the cortical and epidermal symbiotic program. *The Plant Journal*, 67(5), 929–940.
- Kutoš, T., Golob, T., Kač, M., & Plestenjak, A. (2003). Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chemistry*, 80(2), 231–235. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00258-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00258-3)
- Laloum, T., Baudin, M., ... de Carvalho-Niebel, F. (2014). Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *The Plant Journal*, 79(5), 757–768.

- Lauressergues, D., Delaux, P., & Formey, D. (2012). The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *The Plant*. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2012.05099.x/full>
- Legocki, A. B. (Andrzej B. ., Bothe, H. (Hermann), & Pühler, A. (1996). *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture*.
- Li, X., Duan, X., ... Yin, J. (2006). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis. *Plant Physiology*, 141(4), 1167–1184.
- Liu, W., Han, X., Zhan, G., Zhao, Z., Feng, Y., & Wu, C. (2015). A novel sucrose-regulatory MADS-Box transcription factor GmNMHC5 promotes root development and nodulation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20657–20673.
- Machray, G. C., Hedley, P. E., Davidson, D., Ibrahim, A. F. M., Watters, J. A., & Brown, J. W. S. (n.d.). Promoting plant promoters. Retrieved from <http://www.scri.ac.uk/scri/file/annualreports/1999/10PROPLA.PDF>
- Maillet, F., Poinso, V., Andre, O., Puech-Pagès, V., & Haouy, A. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v469/n7328/abs/nature09622.html>
- Manchanda, G., & Garg, N. (2007). Endomycorrhizal and rhizobial symbiosis: How much do they share? *Journal of Plant Interactions*, 2(2), 79–88. <https://doi.org/10.1080/17429140701558000>
- Mankin, S. L., Hill, D. S., ... Ireland, L. (2007). Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPB2659) plasmid pRi2659. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6), 521–535.
- Marini, A., Springael, J., Frommer, W. B., & André, B. (2000). Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Molecular Microbiology*, 35(2), 378–385.
- Marjamaa, K., Hildén, K., ... Lundell, T. (2006). Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology*, 61(4–5), 719–732.
- Markmann, K., Giczey, G., & Parniske, M. (2008). Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biol*. Retrieved from <http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0060068>
- Martín-Trillo, M., & Cubas, P. (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science*, 15(1), 31–39.

- Meadows, D., Meadows, D., & Randers, J. (1992). Beyond the limits: confronting global collapse envisioning a sustainable future. Retrieved from <http://www.popline.org/node/320662>
- Messinese, E., Mun, J., & Yeun, L. (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant*-. Retrieved from <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-20-8-0912>
- Middleton, P. H., Jakab, J., ... Kereszt, A. (2007). An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *The Plant Cell*, *19*(4), 1221–1234.
- Miyata, K., Kozaki, T., ... Kobae, Y. (2014). The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant and Cell Physiology*, *55*(11), 1864–1872.
- Mortier, V., Den Herder, G., ... Goormachtig, S. (2010). CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiology*, *153*(1), 222–237.
- Murray, J. D., Karas, B. J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., & Szczyglowski, K. (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science*, *315*(5808), 101–104.
- Murray, J. D., Muni, R. R. D., ... Wen, J. (2011). Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, *65*(2), 244–252.
- Mylona, P., Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, *7*(7), 869. <https://doi.org/10.2307/3870043>
- Nallu, S., Silverstein, K. A. T., Samac, D. A., Bucciarelli, B., Vance, C. P., & VandenBosch, K. A. (2013). Regulatory patterns of a large family of defensin-like genes expressed in nodules of *Medicago truncatula*. *PLoS One*, *8*(4), e60355.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M.-K., Aguirre, A.-L., Gómez, B.-M., & Lara, M. (2017). Plant promoter analysis: Identification and characterization of root nodule specific promoter in the common bean. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (130), e56140–e56140.
- Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M.-K., Alvarado-Affantranger, X., Quinto, C., Sánchez, F., & Lara, M. (2016). A Legume TOR Protein Kinase Regulates *Rhizobium* Symbiosis and Is Essential for Infection and Nodule Development. *Plant Physiology*, *172*(3), 2002–2020. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00844>
- Nature Education. (2014). Promoter | Learn Science at Scitable. Retrieved May 21, 2017, from <https://www.nature.com/scitable/definition/promoter-259>

- Newsham, K. K., Fitter, A. H., & Watkinson, A. R. (1994). Root Pathogenic and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Determine Fecundity of Asymptomatic Plants in the Field. *The Journal of Ecology*, *82*(4), 805. <https://doi.org/10.2307/2261445>
- Nova-Franco, B., Íñiguez, L. P., ... Girard, L. (2015). The miR172c-AP2-1 node as a key regulator of the common bean-rhizobia nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiology*, pp-114.
- Novero, M., Faccio, A., ... Bonfante, P. (2002). Dual requirement of the LjSym4 gene for mycorrhizal development in epidermal and cortical cells of *Lotus japonicus* roots. *New Phytologist*, *154*(3), 741–749.
- Nyau, V. (2014). NUTRACEUTICAL PERSPECTIVES AND UTILIZATION OF COMMON BEANS (*PHASEOLUS VULGARIS* L.): A REVIEW. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, *14*(7). Retrieved from <http://eds.a.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=4&sid=44bf5f25-8e3d-4ef5-a4ef-b5302e1b7bee%2540sessionmgr4008&hid=4113>
- OECD. (2016). Common bean (*Phaseolus vulgaris*). In *Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology* (pp. 187–210). Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). <https://doi.org/10.1787/9789264253421-7-en>
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 252.
- Oldroyd, G. E. D., Harrison, M. J., & Udvardi, M. (2005). Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant Physiology*, *137*(4), 1205–1210. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057661>
- Olsson, P. ., Thingstrup, I., Jakobsen, I., & Bååth, E. (1999). Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biology and Biochemistry*, *31*(13), 1879–1887. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00119-4)
- Patent Lens. (n.d.). Promoters Used to Regulate Gene Expression - Overview. Retrieved May 21, 2017, from <http://www.bios.net/daisy/promoters/768.html>
- Peking University. (2010). PlantTFDB. Retrieved from <http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn>
- Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., & Tempé, J. (1983). Further extension of the opine concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *MGG Molecular & General Genetics*, *190*(2), 204–214. <https://doi.org/10.1007/BF00330641>
- Pirozynski, K. A., & Dalpe, Y. (1989). Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis*.

- Pirozynski, K. A., & Malloch, D. W. (1975). The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Bio Systems*, 6(3), 153–164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1120179>
- Plasencia, A., Soler, M., ... Grima-Pettenati, J. (2016). Eucalyptus hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant Biotechnology Journal*, 14(6), 1381–1393.
- Popp, C., & Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 458–467.
- Provorov, N., Borisov, A., & Tikhonovich, I. (2002). Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *Journal of Theoretical Biology*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519301924531>
- Pumplin, N., Mondo, S. J., Topp, S., Starker, C. G., Gantt, J. S., & Harrison, M. J. (2010). Medicago truncatula Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal*, 61(3), 482–494.
- Purseglove, J. W. (John W. (1987). *Tropical crops. Dicotyledons*. Longman Scientific & Technical.
- Rao, N. S. S. (1982). Biofertilizers. *Interdisciplinary Science Reviews*, 7(3), 220–229. <https://doi.org/10.1179/isr.1982.7.3.220>
- Reddy DMR, S., Schorderet, M., Feller, U., & Reinhardt, D. (2007). A petunia mutant affected in intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Journal*, 51(5), 739–750.
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., & Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), 11841–11843. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.11841>
- Riva Palacio, V., Arias, J. de D., & Gispert, C. (1999). *México a través de los siglos*. Barcelona España: Océano. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/mexico-a-traves-de-los-siglos/oclc/51533122>
- Roberts, N. J., Morieri, G., ... Downie, A. (2012). Rhizobial and mycorrhizal symbioses in Lotus japonicus require lectin nucleotide phosphohydrolase, which acts upstream of calcium signaling. *Plant Physiology*, pp-112.
- Rosegrant, M. W., & Cline, S. A. (2003). Global Food Security: Challenges and Policies. *Science*, 302(5652). Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/302/5652/1917.full>
- Roth, L. E., & Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the

- symbiosome membrane comes from three sources. *European Journal of Cell Biology*, 49(1), 13–23.
- Roudier, F., Fedorova, E., ... Kondorosi, E. (2003). The Medicago species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiology*, 131(3), 1091–1103.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., & Uchida, H. (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *The Plant*. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/19/2/610.short>
- SCFBio. (n.d.). Promoter region in Eukaryotes and Prokaryotes. Retrieved May 21, 2017, from <http://www.scfbio-iitd.res.in/tutorial/promoter.html>
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., & Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v402/n6758/abs/402191a0.html>
- Sharma, A. K., Wahab, S., & Srivastava, R. (2010). *Agriculture diversification : problems and perspectives*. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.
- Siddiq, M., Ravi, R., Harte, J. B., & Dolan, K. D. (2010). Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.07.009>
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C., & Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, 363(6424), 67–69. <https://doi.org/10.1038/363067a0>
- Singh, S. P., Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45(3), 379–396. <https://doi.org/10.1007/BF02887079>
- Sinharoy, S., Torres-Jerez, I., ... Udvardi, M. K. (2013). The C2H2 transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, tpc-113.
- Smith, S. E., Read, D. J. (David J. ., & Harley, J. L. (John L. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press.
- Solaiman, Z. M., Abbott, L. K., & Varma, A. (2014). *Mycorrhizal fungi : use in sustainable agriculture and land restoration*.
- Soyano, T., Hirakawa, H., & Sato, S. (2014). NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proceedings of The*. Retrieved

from <http://www.pnas.org/content/111/40/14607.short>

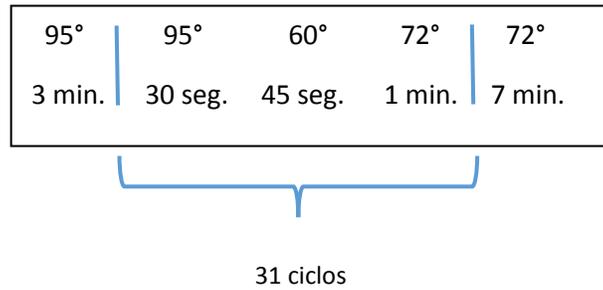
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., Hayashi, M., & Nei, M. (2013). NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genetics*, 9(3), e1003352. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003352>
- Stevens, J. D., Roalson, E. H., & Skinner, M. K. (2008). Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation*, 76(9), 1006–1022.
- Stewart, F., Rolfs, F., & Hall, F. (1900). A fruit-disease survey of western New York in 1900. Retrieved from [https://scholar.google.com.mx/scholar?q=+A+fruit+disease+survey+of+western+New+York+in+1900&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0%2C5](https://scholar.google.com.mx/scholar?q=+A+fruit+disease+survey+of+western+New+York+in+1900&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5)
- Stougaard, J., Schauser, L., Roussis, A., & Stiller, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, 402(6758), 191–195. <https://doi.org/10.1038/46058>
- SUBRAMANIAN, K. S., CHAREST, C., DWYER, L. M., & HAMILTON, R. I. (1995). Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New Phytologist*, 129(4), 643–650. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03033.x>
- Suttipanta, N., Pattanaik, S., Gunjan, S., Xie, C. H., Littleton, J., & Yuan, L. (2007). Promoter analysis of the *Catharanthus roseus* geraniol 10-hydroxylase gene involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1769(2), 139–148.
- Suzaki, T., Yano, K., Ito, M., Umehara, Y., Suganuma, N., & Kawaguchi, M. (2012). Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development*, 139(21), 3997–4006.
- Takeda, N., Maekawa, T., & Hayashi, M. (2012). Nuclear-localized and deregulated calcium-and calmodulin-dependent protein kinase activates rhizobial and mycorrhizal responses in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell*, tpc-111.
- Taylor, T. N., Remy, W., Hass, H., & Kerp, H. (1995). Fossil Arbuscular Mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia*, 87(4), 560. <https://doi.org/10.2307/3760776>
- Tepfer, D., & Tempé, J. (1981). Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium* rhizogenes, souche A4. *CR Acad. Sci*, 292, 153–156.
- Tirichine, L., Sandal, N., ... Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*, 315(5808), 104–107.

- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell*, *15*(8), 1749–1770.
- Tscharntke, T., Clough, Y., ... Whitbread, A. (2012). Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biological Conservation*, *151*(1), 53–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.068>
- Udvardi, M. K., & Day, D. A. (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual Review of Plant Biology*, *48*(1), 493–523.
- van Noorden, G. E., Kerim, T., Goffard, N., Wiblin, R., Pellerone, F. I., Rolfe, B. G., & Mathesius, U. (2007). Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, *144*(2), 1115–1131.
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *43*(5), 383–403.
- Velasco-González, O., San Martín-Martínez, E., Aguilar-Méndez, M., Pajarito-Ravelero, A., & Mora-Escobedo, R. (2013). Thermal and physicochemical properties of different bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioagro*, *25*(3), 161–166.
- Veltcheva, M., & Svetleva, D. L. (2005). In vitro regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. *Journal of Central European*. Retrieved from  
[http://hrcak.srce.hr/index.php?id\\_clanak=16830&show=clanak](http://hrcak.srce.hr/index.php?id_clanak=16830&show=clanak)
- Venkateshwaran, M., Volkening, J., & Sussman, M. (2013). Symbiosis and the social network of higher plants. *Current Opinion in Plant*. Retrieved from  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526612001653>
- Vernié, T., Kim, J., ... Oldroyd, G. E. D. (2015). The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the *Medicago truncatula* root. *The Plant Cell*, tpc-15.
- Wang, E., Schornack, S., ... Oldroyd, G. E. D. (2012). A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Current Biology*, *22*(23), 2242–2246.
- Wang, H., Wang, H., Liu, R., Xu, Y., Lu, Z., & Zhou, C. (2018). Genome-Wide Identification of TCP Family Transcription Factors in *Medicago truncatula* Reveals Significant Roles of miR319-Targeted TCPs in Nodule Development. *Frontiers in Plant Science*, *9*.
- Wegel, E., Schauser, L., Sandal, N., Stougaard, J., & Parniske, M. (1998). Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *11*(9), 933–936.

- Willmitzer, L., Sanchez-Serrano, J., Buschfeld, E., & Schell, J. (1982). DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. *Molecular and General Genetics MGG*, 186(1), 16–22.
- Xie, F., Murray, J., & Kim, J. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of The*. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/109/2/633.short>
- Xue, L., Cui, H., Buer, B., Vijayakumar, V., Delaux, P.-M., Junkermann, S., & Bucher, M. (2015). Network of GRAS transcription factors involved in the control of arbuscule development in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, pp-114.
- Yang, S.-Y., Grønlund, M., ... Salamin, N. (2012). Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the PHOSPHATE TRANSPORTER1 gene family. *The Plant Cell*, tpc-112.
- Yano, K., Yoshida, S., ... Sato, S. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20540–20545.
- Yoshida, S., & Parniske, M. (2005). Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/280/10/9203.short>
- Zhang, Q., Blaylock, L. A., & Harrison, M. J. (2010). Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Cell*, tpc-110.
- Zuccherro, J. C., Caspi, M., & Dunn, K. (2001). ngl9: a third MADS box gene expressed in alfalfa root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1463–1467.

## 12. Anexos

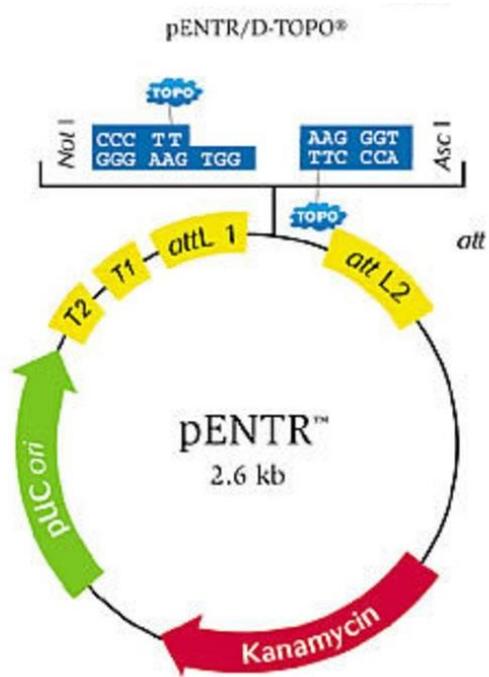
### 12.1 Figuras



**Fig. A1** Programa de PCR para la amplificación del promotor de NIN. Nótese que la temperatura de alineamiento de los oligos específicos para amplificar el promotor de NIN, es de 60°. Temperatura en grados centígrados.

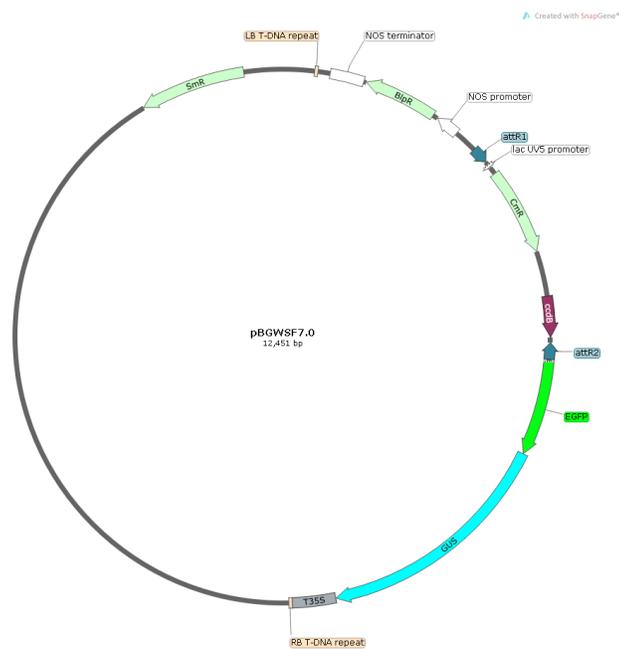
<b>pENTR-clone</b>	
Fragmento prNIN	4 µL
NaCl	1 µL
Vector pENTR/D-TOPO	0.5 µL
H <sub>2</sub> O	0.5 µL

**Fig. A2** Reacción para la inserción del promotor de NIN en el vector de entrada pENTR/D-TOPO. Esta reacción resulta en la inserción direccional del fragmento dentro del vector, debido al inicio CACC previamente sintetizado en el fragmento.



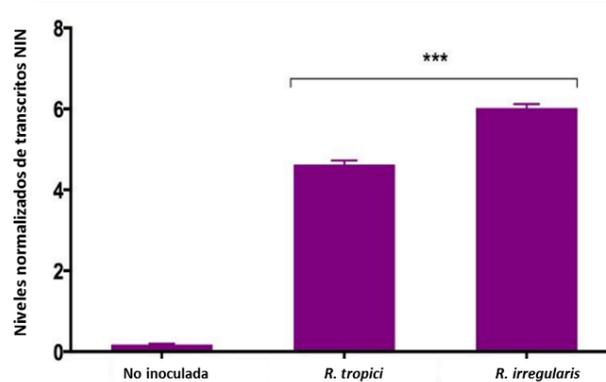
**Fig. A3** Plásmido pENTR/D-TOPO y elementos que lo componen

Tomado de: <https://www.thermofisher.com>



**Fig. A4** Plásmido pBGWSF7 y elementos que lo componen

Imagen proporcionada por Dra. Kalpana Nanjareddy



**Fig. A5** Análisis de expresión de NIN en condiciones inoculadas con el *Rhizobium* o mycorrhiza en *Phaseolus vulgaris*. Se extrajo el ARN total a partir de raíces de *P. vulgaris* silvestre sin inoculación o 5 días después de haber inoculado ya sea con *R. tropici* o con *R. irregularis*. Se usaron oligos específicos para medir los niveles de transcritos de NIN. La acumulación de transcritos se normalizó con la expresión de Ef1 $\alpha$  como gen de referencia. Se tomaron tres replicas biológicas por cada tipo de tratamiento (n > 9). La significancia estadística de las diferencias entre las distintas muestras se determinó usando prueba t dependiente para muestras apareadas (\*\*\*, P < 0.001). Las barras de error representan el  $\pm$  SEM (promedio de error estándar).

## 12.2 Tablas

**Tabla A1** Concentraciones del mix para la PCR del fragmento correspondiente al promotor de NIN.

Reactivos	1X
Templado prNIN	0.5 $\mu$ L
10X Roche PCR Buffer + Mg	2 $\mu$ L
10mM dNTP Mix	0.5 $\mu$ L
Oligo prNIN FOR2GN	0.5 $\mu$ L
Oligo prNIN Rev	0.5 $\mu$ L
50X Taq polimerasa Advantage	0.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	15.5 $\mu$ L

El volumen total de la reacción fue de 20  $\mu$ L. Se empleó una polimerasa proof-reading, es decir, que corrige sus errores, esto debido a que la banda resultante, una vez corrido el producto por electroforesis, fue purificada.

**Tabla A2** Composición de solución B&D.

Solución stock	Componentes	Molaridad final	Fórmula
A	Ca	1000 $\mu$ M	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
B	P	500 $\mu$ M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
C	Fe	10 $\mu$ M	Fe-citrato
D	Mg	250 $\mu$ M	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
	K	1500 $\mu$ M	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	S	500 $\mu$ M	
	Mn	1 $\mu$ M	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
	B	2 $\mu$ M	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>
	Zn	0.5 $\mu$ M	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
	Cu	0.2 $\mu$ M	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
	Co	0.1 $\mu$ M	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
	Mo	0.1 $\mu$ M	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O

**Tabla A3** Composición del medio PY sólido

Reactivo	Concentración
Peptona	5 gr/L
Extracto de levadura	3 gr/L
Agar	15 gr/L
Cloruro de Calcio	700 mM
Ácido nalixídico	20 $\mu$ L/mL

**Tabla A4** Composición del buffer GUS:X-gluc para un volumen de 10mL.

Reactivo	Volumen	Molaridad final
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.615 mL	100 mM
KHPO <sub>4</sub>	0.385 mL	100 mM
EDTA	200 µL	10 mM
Triton X	10 µL	0.1%
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	50 µL	0.5 mM
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	50 µL	0.5 mM
X-gluc	100 µL	1 mM
H <sub>2</sub> O destilada	8.59 mL	

### 12.3 Secuencia

Promotor de NIN (718 pb)

ATAGCTCCCAAAATGGTATGTGTTTTGTTTGTAAACATCACATGAATTTTCCAATTA AAAAAGCTCTCAAATATAAATCT  
 ATAGTTTTAGCAGGAATGTTTTGTAAAGTTGGTATAATGGGGAGTGAGGCCCTCCTTTCTAACTTGTGGGTCTACTG  
 AACTGTAGACAATTTGCAGTTGTCTCGGAGTCATTAATAGAAGAGTTCGATGAGCAGGTGAGTACTGTATAAGCAA  
 AGCAGCGCCCTCGCCAGATCGATCACTTCAGCAACATTCCTTTCTTTCTTTCTACCTTTTTCTCTCCACAACCTTTTCT  
 CTTCTTCATCGCACTTTATTAAGAATCTGTAAGGTGAGGGAGTCTCCTACTTCATCCCATTCTCCTTCTATCTCTGTCTC  
 TCTGCTTGCATGCTAATGTTAACTTCATTTATCTCTCACCATTGTTTAATATATGCATTTATATATCAATTATCGACCTAAG  
 ATACAACATACTTCAGGCTCCAAGTGCTATACCAGACAATAAAACGCTTCTGATTTAGTCTCGCAACATACTTAATGTTT  
 GCTTCTACTTCATTGAATGTTAATTTGGATGCTATATGCTAAGATATTTATTGTGTTTATTGAGTGAGTGGTAATAAAG  
 CTATAAATAAATTATATACAGGATCAGTGGAGATAGGGGTGTTAGTTA GTTAGTTAGTGAAGGAAGATGGAAT